Aus dem Institut für Physiologie der Universität Tübingen
Abteilung Physiologie I
Abteilungsleiter: Professor Dr. F. Lang

Regulation der Exzitatorischen Aminosäure Transporter EAAT1, EAAT2, EAAT3 und EAAT5 durch die Serum- und Glukokortikoid-abhängige Kinase SGK und die Ubiquitinligase Nedd4-2

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Roman Schniepp

aus
Göppingen
2006

Dekan: Professor Dr. Ingo B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lang

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. K. Kohler

3. Berichterstatter: Professor Dr. H. Oberleithner

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

1. Einleitung 7

1.1 Die physiologische Rolle des Glutamats 9
1.1.1 Aufbau und Struktur des Glutamats 9
1.1.2 Synthese, Stoffwechsel und Abbau des Glutamats 9
1.1.3 Funktion der Aminosäure Glutamat im Organismus 12

1.2 Die Familie der Exzitatorischen Aminosäure Transporter (EAAT) 12
1.2.1 Die Superfamilie der Natrium-abhängigen Transporter für anionische und zwitterionische Aminosäuren 12
1.2.2 Struktur der EAAT 13
1.2.3 Transporteigenschaften der EAAT 17
1.2.4 Expression und Lokalisation der EAAT 18
1.2.5 Die physiologischen Aufgaben der EAAT 19
1.2.6 Störungen der glutamatergen Neurotransmission und der EAAT 21

1.3 Serum- und Glukokortikoid-induzierte Kinase 23
1.3.1 Einteilung der hSGK innerhalb der Proteinkinasen 23
1.3.2 Isoformen und Gewebeverteilung 24
1.3.3 Regulation der SGK 24
1.3.4 Interaktion der SGK mit anderen Proteinen 26
1.3.5 Die physiologische Funktion der hSGK 28

1.4 Fragestellung der Arbeit 29

2. Material und Methoden 31

2.1 Verwendete Lösungen und Substanzen 31

2.2 Oozyten als Expressionssystem 33
2.2.1 Oozytenpräparation 35
2.2.2 cRNA-Synthese und -Injektion 37

2.3 Elektrophysiologische Methoden 39
2.3.1 Potentialmessung (current clamp) 39
2.3.2 Spannungsklemme (Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp [TEVC]) 40
2.3.3 Aufbau des Arbeitsplatzes für Voltage Clamp 41
2.3.4 Durchführung der Experimente 41

2.4 Auswertung und Statistik 42

2.5 Immunhistochemie 44
2.5.1 Gewebeentnahme und Präparation 44
2.5.2 Immunhistochemische Verfahren 45

3. Versuche und Ergebnisse 47

3.1 Regulation des EAAT1 47
3.1.1 EAAT1 und hSGK 47
3.1.2 Inhibition des EAAT1-Transports durch Nedd4-2 52
3.1.3 Kinetische Untersuchung der EAAT1 Regulation 55

3.2 Regulation des EAAT2 57
3.2.1 EAAT2 und hSGK 57
3.2.2 Inhibition des EAAT2-Transports durch Nedd4-2 60
3.2.3 EAAT2 und GTRAP48 63

3.3 Regulation des EAAT3 64
3.3.1 Immunolokalisierung des EAAT3 und der hSGK 64
3.3.2 Elektrophysiologische Untersuchung von EAAT3 und SGK 68
3.3.3 Keine Inhibition des EAAT3-Transports durch Nedd4-2 70
3.3.4 EAAT3 und GTRAP48 72

3.4 Regulation des EAAT5 73
3.4.1 EAAT5 und hSGK 73
3.4.2 Keine Inhibition des EAAT5-Transports durch Nedd4-2 76
3.4.3 EAAT5 und GTRAP48 und NHERF2 77

4. Diskussion und Interpretation 80

4.1 Fehlerdiskussion 80
4.1.1 Oozyten als Expressionssystem 80
4.1.2 Oozyten und cRNA 81
4.1.3 Lösungen 83
4.1.4 Geräte 83

4.2 Regulation des EAAT1 _____ 84

4.3 Regulation des EAAT2 _____ 89

4.4 Regulation des EAAT3 _____ 95

4.5 Regulation des EAAT5 _____ 99

4.6 Integrierende Diskussion der Regulation aller EAAT 101

5. Zusammenfassung _____ 104

6. Literatur _____ 106

6.1 Zitierbare Abstracts _____ 106

6.2 Publikationsverzeichnis _____ 106

6.3 Literaturverzeichnis _____ 107

7. Anhang _____ 120

7.1 Danksagung _____ 120

7.2 Lebenslauf _____ 122

1. Einleitung

Das Nervensystem des Menschen setzt sich aus dem zentralen und dem peripheren Nervensystem zusammen. Dabei umfasst das Zentralnervensystem sowohl das Gehirn als auch das Rückenmark.
Im Nervensystem gibt es zwei große Zellklassen: die Neuronen und die Gliazellen. Die Neuronen stellen dort die zentralen Signalübertragungseinheiten dar. Das menschliche Gehirn besteht aus ungefähr 10^{11} Neuronen, wobei jedes Neuron ca. 1000 Synapsen bildet. Dabei unterscheidet man eine elektrische von einer chemischen Synapse. Bei der elektrischen Synapse wird das elektrische Erregungssignal über sogenannte Gap junctions von Zelle zu Zelle weitergegeben. Im Gegensatz dazu sind die Neuronen einer chemischen Synapse durch einen ca. 20-40 nm breiten Spalt voneinander getrennt. Die Kommunikation der Neuronen geschieht durch einen Transmitterstoff, der im präsynaptischen Neuron in Vesikeln gespeichert ist. Diese transmittergefüllten Vesikel verschmelzen nach Eintreffen des Erregungssignals mit der präsynaptischen Membran, wodurch der Transmitter in den synaptischen Spalt freigesetzt wird. Der Transmitter diffundiert daraufhin durch den synaptischen Spalt und lagert sich an postsynaptisch lokalisierten Rezeptoren an, die entweder die Offenwahrscheinlichkeit von Ionenkanälen beeinflussen oder eine sekundäre Vermittlerkaskade anstoßen. Beide Ereignisse führen zur Ausbildung eines elektrischen Signals im postsynaptischen Neuron.

Neben Neuronen findet man noch Gliazellen, die selbst erst 1846 von dem Berliner Pathologen Rudolf Virchow entdeckt wurden. Sie bilden zahlenmäßig den Hauptanteil des Nervensystems, sind sie doch etwa 10mal häufiger als Neuronen.
Gliazellen sind in jüngster Zeit mehr und mehr Gegenstand der Forschung geworden, da man erkannte, dass auch sie an der Signaltransduktion beteiligt sind. Gliazellen besitzen nämlich sehr komplexe Stoffwechselwege, die am Transmitterstoffwechsel wesentlich beteiligt sind. Dies, sowie ihre wichtigen

Transporteigenschaften, führen dazu, dass Gliazellen heutzutage in der Physiologie einer Synapse eine wichtige Rolle spielen.

1.1 Die physiologische Rolle des Glutamats

1.1.1 Aufbau und Struktur des Glutamats

Glutamat gehört zu der Gruppe der 20 proteinogenen Aminosäuren. Sie ist eine nicht essentielle Aminosäure und trägt genauso wie Aspartat eine saure Seitenkette, die bei physiologischen pH-Werten fast stets negativ geladen ist. Der pk-Wert der sauren Seitenkette beträgt bei Aspartat und Glutamat 4,4. Die Seitenkette trägt eine Carboxylgruppe.

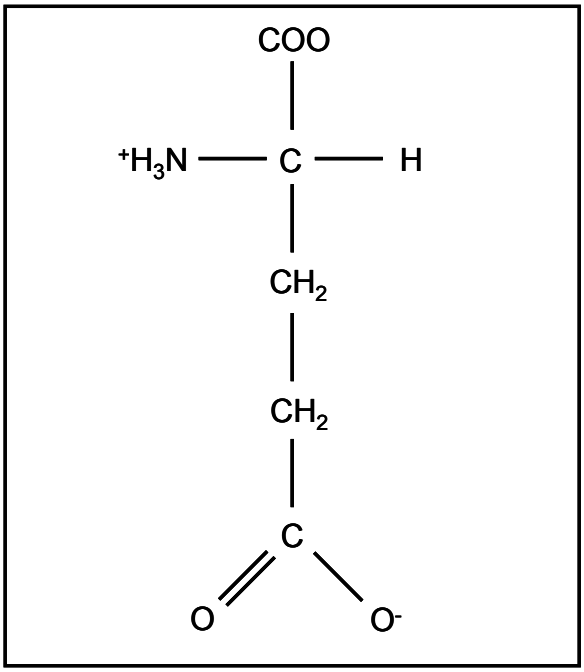

Abbildung 1: Struktur der Aminosäure Glutamat

1.1.2 Synthese, Stoffwechsel und Abbau des Glutamats

Als nicht essentielle Aminosäure können Zellen Glutamat aus anderen Molekülen synthetisieren. Trotzdem kann es auch über Transportermoleküle im Dünndarm direkt aufgenommen werden.

Vor allem α-Ketoglutarat und Glutamin sind Moleküle, aus denen Glutamat in einer 1-Schritt-Reaktion gebildet werden kann.
Im Gehirn findet sich eine charakteristische Expression der Enzyme Glutaminase und Glutaminsynthetase. Die Glutaminase scheint überwiegend neuronal vorzukommen und katalysiert die Bildung von Glutamat aus Glutamin. Dieses Glutamin, das keine exzitatorische Eigenschaft besitzt, entsteht unter anderem durch die gliale Glutaminsynthetase. Die Gliazellen nehmen durch die hoch affinen Glutamattransporter rasch extrazelluläres Glutamat auf. Es wird dann mit Hilfe der Glutaminsynthetase zu Glutamin umgewandelt. Dadurch entsteht ein Glutamat/Glutamin-Zyklus, der im menschlichen Gehirn eine Schlüsselrolle im Rückgewinn des Transmitters Glutamat darstellt.
Auch in der Biosynthese von γ-Aminobutyrat (GABA) spielt Glutamat eine wesentliche Rolle. γ-Aminobutyrat entsteht durch Decarboxylierung von Glutamat, eine Reaktion, die durch das Enyzm Glutamat-Decarboxylase katalysiert wird. Pyridoxalphosphat ist hierbei die prosthetische Gruppe. γ-Aminobutyrat wird durch Transaminierung zu Succinatsemaldehyd inaktiviert und dann zu Succinat oxidiert. Dieses Succinat kann dann durch den Krebs-Zyklus wieder in Glutamat überführt werden.

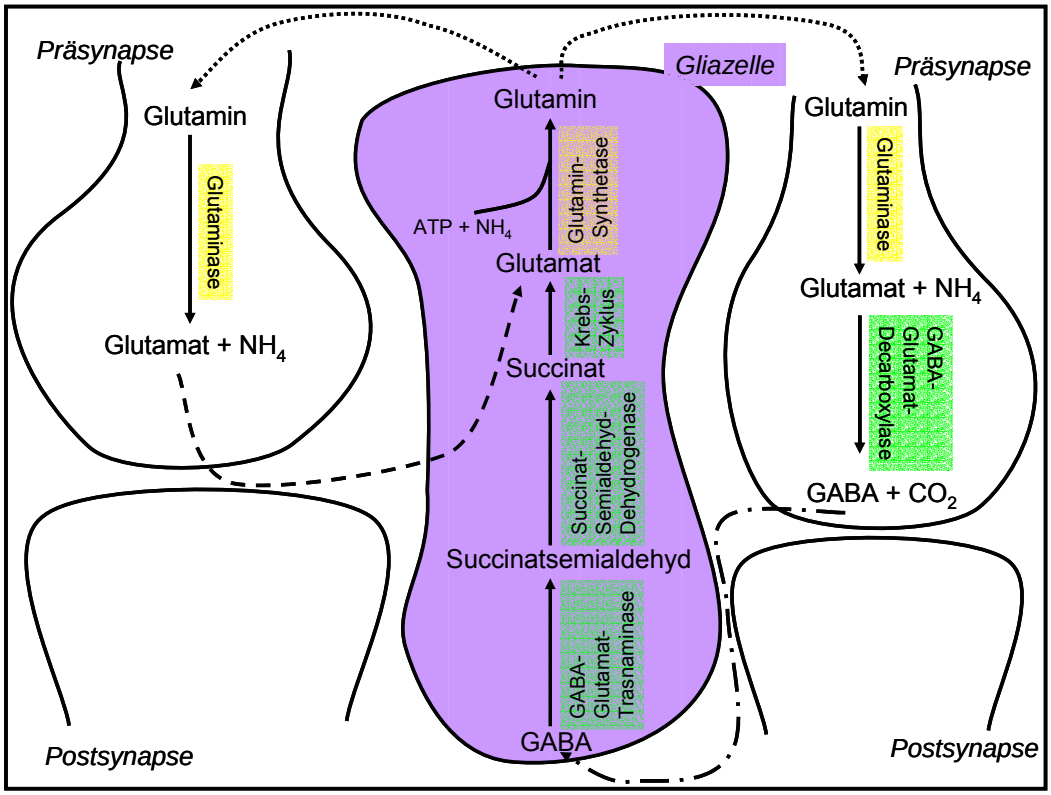

Abbildung 2: **Schematische Darstellung des Glutamat/Glutamin-Zyklus des Gehirns und der Biosynthese und Abbau von GABA**

Die Aspartat- und die Alanin-Aminotransferasen spielen im Abbau von Aminosäuren eine entscheidende Rolle. Denn hier werden α-Aminogruppen auf α-Ketoglutarat übertragen. Es entsteht Glutamat, das dann wiederum oxidativ desaminiert wird (Glutamatdehydrogenase) und so NH_4^+ liefert.

Es entsteht also wie oben erwähnt aus α-Ketoglutarat Glutamat. Damit besteht eine Verbindung zwischen dem Glukose- und dem Aminosäurestoffwechsel, da α-Ketoglutarat ein Zwischenprodukt des Zitratzyklus ist. Diese Tatsache wird dann wichtig, wenn man bedenkt, dass Glutamat die Blut-Hirn-Schranke nicht überschreiten kann. Es wird vielmehr intrazerebral via α-Ketoglutarat aus Glukose synthetisiert [27].

1.1.3 Funktion der Aminosäure Glutamat im Organismus

Lange Zeit wurde Glutamat nur im Zusammenhang des Aminosäure-stoffwechsels, der Glukoneogenese und der Ammoniakentgiftung gesehen. Erst in den 50er Jahren entdeckte Hayashi [48], dass Glutamat Konvulsionen auslösen könne. Nach Jahren der Forschung und zeitweiliger Ablehnung der Neurotransmitterhypothese wurde erst in den letzten zwei Dekaden Glutamat als wichtiger exzitatorischer Botenstoff wissenschaftlich etabliert [133]. Tatsächlich ist Glutamat der häufigste exzitatorische Neurotransmitter des Gehirns und ist damit in zahlreiche Abläufe des Gehirns involviert, z.B. bei der Gedächtnisfunktion. Zudem ist Glutamat auch in der Retina der häufigste exzitatorische Neurotransmitter [92]. Es wird bei Dunkelheit ständig aus den Photorezeptoren ausgeschüttet. Diese Ausschüttung wird durch Licht reguliert.

1.2 Die Familie der Exzitatorischen Aminosäure Transporter (EAAT)

1.2.1 Die Superfamilie der Natrium-abhängigen Transporter für anionische und zwitterionische Aminosäuren

Die Exzitatorischen Aminosäure Transporter (nachfolgend EAAT genannt) gehören zu der Superfamilie der Natrium-abhängigen Aminosäure-Transporter für anionische und zwitterionische Aminosäuren [81]. Dieser Superfamilie werden acht unterschiedliche Transporter zugeordnet, darunter auch die fünf Subtypen der EAAT.

Transporter	**Herkunft des ersten Klons und *anderer Name***	**Chromosom (human)**	**Länge der Aminosäure-Sequenz**
Transporter für anionische Aminosäuren			
EAAT1	Ratte (Gehirn); *Glast*	5p13 (191,284,535), 5p11-p12 (516)	542
EAAT2	Ratte (Gehirn); *GLT-1*	11p12-p13 (310), 11p11.2-p13 (534)	574
EAAT3	Kaninchen (Dünndarm); *EAAC1*	9p24 (400)	524
EAAT4	Mensch (Zerebellum)	Nicht bekannt	564
EAAT5	Mensch (Retina)	Nicht bekannt	560
Transporter für zwitterionische Aminosäuren			
ASCT1	Mensch (Motokortex; Hippokampus); *SATT*	2p13-p15 (214)	532
mASCT2	Maus (Adipozyten) ; *AAAT*	Nicht bekannt	553
ATB^0	Mensch (Chorioncarcinom, Pankreasinsel-Zelllinien)	19q13.3 (236, 269)	541

Tabelle 1: Die Superfamilie der Natrium-abhängigen Transporter für anionische und zwitterionische Aminosäuren [81]

1.2.2 Struktur der EAAT

Drei verschiedene Laboratorien klonierten fast zeitgleich die ersten drei Angehörigen der EAAT-Familie. Stoffel et al. isolierte GLAST-(EAAT1) cDNA während dem Versuch, Galaktosyltransferase aus Rattenhirn zu isolieren. Kanner et al. fand GLT-1-(EAAT2) cDNA [28] und Hediger et al. isolierte EAAC1-(EAAT3) cDNA [59]. Danach klonierte Amara´s Gruppe EAAT4 [37] und etwas später auch EAAT5 [5].

Die Primärsequenzen der EAAT sind zu 36-65% identisch [81]. Über die präzise Transmembran-Topologie herrscht zuweilen jedoch Kontroversität. Aktuell gibt es drei verschiedene Transmembran-Strukturmodelle, die alle zwischen sechs und zehn Transmembrandomänen enthalten. Einig sind sich die Autoren dieser Modelle nur über den N-Terminus der Proteinstruktur: Dort existieren sechs α-Helices, die die Zellmembran durchdringen. Über die C-Terminus nahe Region herrscht jedoch Uneinigkeit. Kanner´s Gruppe schlägt hier zwei weitere α-Helices [89], Kanai und Hediger vier α-Helices [59] und Stoffel vier β-Faltblattstrukuren als Transmembrandomänen vor [51, 113]. Alle drei Modelle sehen sowohl den N-Terminus als auch den C-Terminus intrazellulär [69, 125]. Die C-terminale Region scheint stärker konserviert und damit einander ähnlicher zu sein als die n-terminale Region. Bei allen fünf EAAT existiert eine große, zwischen der dritten und der vierten Transmembrandomäne gelegene, extrazelluläre Schleife, in der ein bis drei Glykosilierungsequenzen liegen [41, 102].

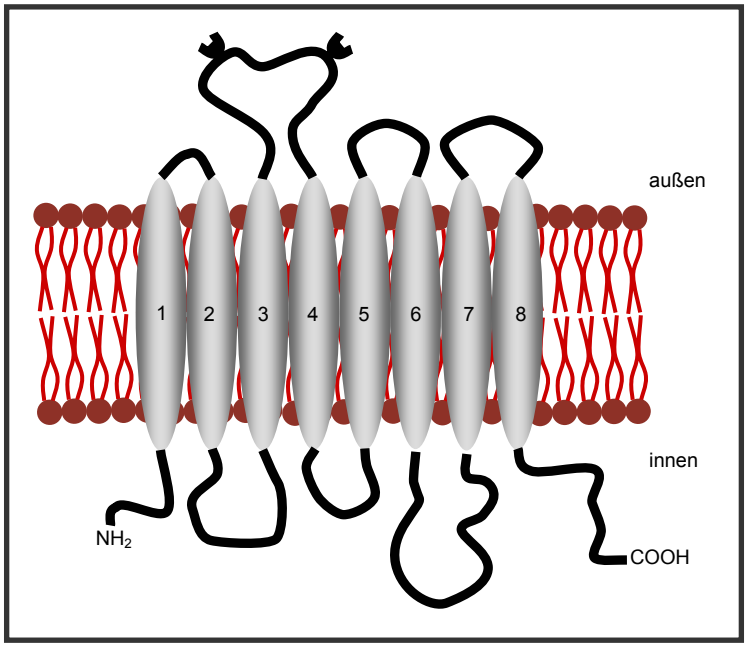

Abbildung 3: Membrantopologie (acht α-Helices als Transmembrandomänen) der EAAT nach Kanner et al.

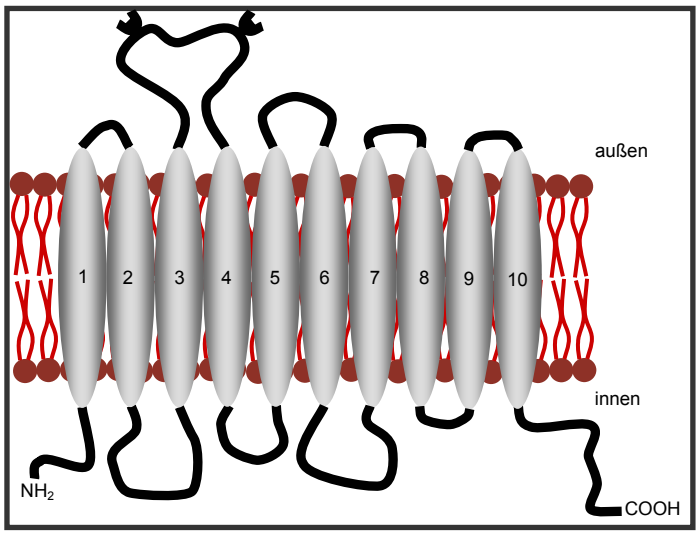

Abbildung 4: Membrantopologie (zehn α-Helices als Transmembrandomänen) der EAAT nach Kanai et al.

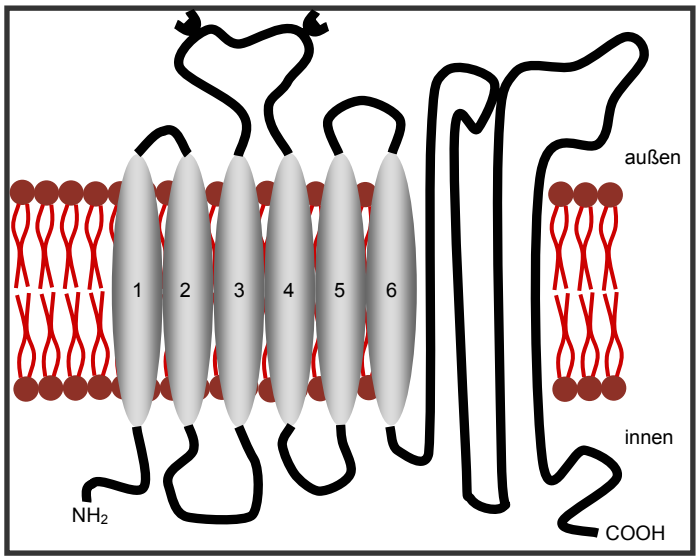

Abbildung 5: Membrantopologie (sechs α-Helices und vier β-Faltblattstrukturen als Transmembrandomänen) der EAAT nach Stoffel et al.

Für die Interaktion mit anderen Proteinen sind Sequenzen der Proteinstruktur wichtig, die potentielle Erkennungssequenzen für interagierende Proteine darstellen. Diese Arbeit untersucht die Protein-Protein Interaktion durch drei bekannte Sequenzen:
die SGK-Phsophorylierungs-Site, das PY-Motiv und die PDZ-Domäne.

SGK-Phosphorylierungs-Sites findet man in EAAT1, EAAT4 und EAAT5. Es sind Aminosäuresequenzen, an die SGK bevorzugt phosphoryliert. Die SGK-Erkennungssequenz des EAAT5 liegt nach heutiger Ansicht der Membrantopologie extrazellulär. Die SGK wirkt jedoch intrazellulär. Dies erschwert die Annahme einer direkten Phosphorylierungsfähigkeit der SGK an EAAT5.
Das PY-Motiv ist eine Prolin-reiche Sequenz in Proteinen. Die Ubiquitinligase Nedd4-2 bindet bevorzugt an dieses PY-Motiv und ist dann in der Lage, das PY-Motiv enthaltende Protein mit Ubiquitin zu markieren. Man findet nur in der Aminosäuresequenz des EAAT5 ein Prolin-reiches PY-Motiv.
Die Überprüfung der Proteinstrukturen der EAAT auf SGK Phosphorylierungs-Sites und PY-Motiven erfolgte durch Sequenzvergleich mit Hilfe der online zu Verfügung stehenden Datenbank SWISSPROTEIN und dem Programm SCAN PROSITE.

Auch PDZ-Domänen sind wichtige Bereiche für Proteininteraktionen [39]. Proteine, die in direkter Weise nicht miteinander interagieren können, enthalten oft PDZ-Domänen, an denen dritte Proteine binden können und damit erst eine Interaktion möglich machen. Zu diesen PDZ-Domänen enthaltenden Proteinen zählen der Natrium/Protonen-Austauscher regulierende Faktor (NHERF1 und NHERF2), Syntenin, Mubble, GTRAP48 und viele andere. Von den EAAT enthält nur EAAT5 eine PDZ-Domäne.

1.2.3 Transporteigenschaften der EAAT

Substrate der EAAT sind L-Glutamat, L-und D-Aspartat, nicht jedoch D-Glutamat. Beim Transport von Glutamat kommt es noch zusätzlich zum Ko- bzw. Gegentransport von Natrium, Kalium, Protonen oder Hydroxylionen. Im einzelnen besteht ein Kotransport von 2-3 Natriumionen und ein Gegentransport von einem Kaliumion, der eine Abhängigkeit 1. Grades von der externen L-Glutamat und internen Kaliumkonzentration und eine sigmoidale Abhängigkeit von der externen Natriumkonzentration zeigt. Außerdem soll der Transport eines pH-ändernden Ions, also entweder ein Kotransport eines Protons oder ein Gegentransport eines Hydroxylions bestehen [7, 61].
Der Glutamattransport der EAAT ist, zusammenfassend gesagt, mit einer Ladungsverschiebung über die Zellmembran verbunden und damit also elektrogen, was eine Vorraussetzung für die Messbarkeit mittels Voltage-Clamp Technik ist.
Die Glutamataufnahme-Kapazität nimmt von EAAT1 zu EAAT5 gleichmäßig hin ab. Eine Ausnahme bildet hier jedoch EAAT2, der die größte Glutamataufnahme-Kapazität besitzt [76].

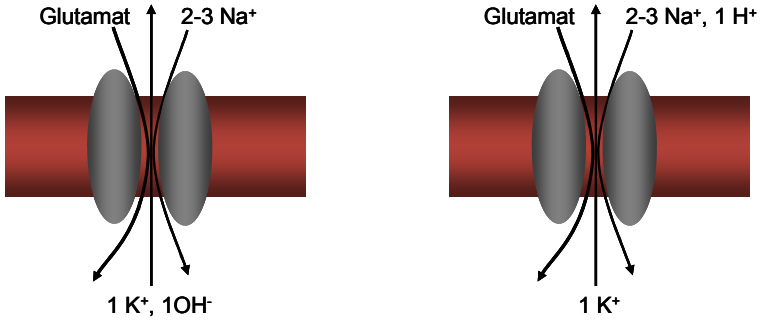

Abbildung 6: Stöchiometrie des EAAT-Transports

Interessanterweise wurde von Fairman 1995 gezeigt, dass EAAT4 eine intrinsische Chloridleitfähigkeit besitzt. Nachfolgende Studien konnten dies bestätigen und darüber hinaus zeigen, dass diese Eigenschaft allen EAAT

zugeschrieben werden kann [122]. Die Chloridleitfähigkeit zeigt dabei eine strenge Abhängigkeit von der Bindung von Glutamat und Natrium am EAAT. Demgegenüber ist der Glutamattransport nur von Natrium und Kalium abhängig und nicht von Chlorid. Wichtig ist zudem, dass die EAAT unterschiedliche intrinsische Chloridleitfähigkeiten besitzen. Die Chloridleitfähigkeit ist besonders groß bei EAAT4 und EAAT5, und beträgt bei EAAT4 ca. 95% [37] und bei EAAT5 fast 100% [5] des durch Voltage clamp messbaren Stroms.
Die K_m-Werte als Maß der Affinität des Glutamattransports sind in der Familie der EAAT sehr unterschiedlich. Allgemein lässt sich sagen, dass die EAAT eine hohe Affinität für L-Glutamat besitzen und die Affinität zu L- und D-Aspartat kleiner ist. Die nachfolgende Tabelle gibt einen kurzen Überblick.

TRANSPORTER	EAAT1	EAAT2	EAAT3	EAAT4	EAAT5
Substrate	L-Glu, L-Asp, D-Asp	L-Glu, L-Asp, D-Asp	L-Glu, L-Asp, D-Asp	L-Glu, L-Asp, D-Asp	L-Glu, L-Asp, D-Asp
K_m-Wert für L-Glutamat, L-und D-Aspartat	15-20 µM	10-20 µM	20-50 µM	2-3 µM	13-64 µM

Tabelle 2: Substrate und K_m-Werte aller EAAT (aus Palacin et al.; Molecular Biology of Mammalian Plasma Membrane Amino Acid Transporters)

1.2.4 Expression und Lokalisation der EAAT

Die Hauptlokalisation der EAAT ist das humane Gehirn. Außerhalb des Gehirns kommen sie im Herzmuskel (EAAT1; EAAT3), im Skelettmuskel (EAAT1), im Dünndarm (EAAT3), in der Leber (EAAT3; EAAT5), in der Niere (EAAT3), in der Lunge (EAAT1; EAAT3) und in der Plazenta (EAAT1; EAAT3; EAAT4) vor [81].

Im Gehirn zeigen die EAAT eine ganz spezielle Lokalisation: EAAT1 findet sich hauptsächlich im Zerebellum, eine geringe Expression zeigt sich aber auch im Hippokampus, Striatum und zerebralem Kortex [18, 69, 102]. EAAT2 ist im zerebralen Kortex, Hippokampus, Thalamus, Striatum, Nukleus accumbens und Zerebellum lokalisiert. In diesen Regionen werden die beiden Glutamattransporter in der Plasmamembran der Astrogliazellen und Bergmanngliazellen (Zerebellum) beobachtet. EAAT1 und EAAT2 sind also gliale Glutamattransporter.
Im Gehirn werden EAAT3 und EAAT4 nur in Neuronen exprimiert [58, 59, 102]. EAAT3 zeigt sich verteilt über beinahe alle Regionen, besonders jedoch im Hippokampus [119].Darüber hinaus findet man EAAT3 in den neuronalen Zellen der Retina. EAAT4 ist fast ausschließlich in den GABAergen Purkinje-Zellen des Zerebellums lokalisiert.
EAAT5 wird sowohl neuronal als auch glial exprimiert. Man findet ihn ganz überwiegend in der menschlichen Retina, genauer in den Photorezeptorzellen der Zäpfchen und Stäbchen, in Bipolarzellen, aber auch in den Müllergliazellen [5].

1.2.5 Die physiologischen Aufgaben der EAAT

Die Aufgabenverteilung der EAAT ist eng an deren Gewebsverteilung geknüpft. So nimmt zum Beispiel EAAT3 durch seine Expression in Epithelzellen des Dünndarms und der Niere an der dort stattfindenden Aminosäureresorption von anionischen Aminosäuren teil [81].
Hauptaufgabe der EAAT ist jedoch eine Konstanthaltung des extrazellulären Glutamats in den Synapsen des Gehirns und der Retina (EAAT5). Durch eine schnelle Clearance von Glutamat aus dem synaptischen Spalt, nehmen die EAAT an der Signalweiterleitung und –transduktion teil. Die hohe Affinität der Transporter ist für eine zügige Aufnahme des Glutamats verantwortlich und führt somit zur prompten Beendigung des Signals. Dieser Mechanismus wird

umso wichtiger, wenn man bedenkt, dass für Glutamat kein Abbauenzym im synaptischen Spalt existiert (wie z.B. die Acetylcholinesterase in cholinergen Synapsen), das eine Beendigung der Signalweitergabe bewirken könnte.
Hinzu kommt, dass Glutamat nicht nur der häufigste Neurotransmitter des Säugetiergehirns, sondern auch ein potentes Neurotoxin ist. Zu hohe extrazelluläre Glutamatkonzentrationen führen zur Überstimulation der ionotropen Glutamatrezeptoren (NMDA; KAINAT; AMPA). Dies wiederum führt über einen exzessiven Einstrom von Kationen (hauptsächlich Kalziumionen) zur Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden, wie Proteinasen, Caspasen, Proteinkinasen, Endonukleasen oder freien Radikalen und folglich zum Untergang der Zelle [106]. Analog führt die Überaktivierung der metabotropen Glutamatrezeptoren über second messenger Kaskaden entweder zur Freisetzung von intrazellulärem Kalzium oder direkt zu den oben genannten Vorgängen. Die glialen EAAT1 und EAAT2 sorgen durch ihre große Glutamat-aufnahmekapazität für gleichbleibend physiologisch niedrige extrazelluläre Glutamatkonzentrationen im Gehirn und sind damit neuroprotektiv.
Nachfolgend wird die Funktionsweise einer glutamatergen Synapse schematisch dargestellt.
Hierbei wird deutlich, dass die Glutamattransporter EAAT aufgrund ihrer unterschiedlichen Lokalisation auch unterschiedliche Aufgaben besitzen.
EAAT1 und EAAT2 transportieren Glutamat in Gliazellen, welches dann zu Glutamin umgewandelt wird. Glutamin, das selbst keine exzitatorische Wirkung besitzt, wird in das Neuron zurücktransportiert und dort wieder zu Glutamat umgewandelt. Demgegenüber sind EAAT3 und EAAT4 vor allem neuronal exprimiert und nehmen somit Glutamat direkt in das post- bzw. präsysnaptische Neuron auf. Dieses Glutamat muss nicht umgewandelt werden und steht der Signalübertragung sofort wieder zur Verfügung. Das bedeutet, dass EAAT3 und EAAT4 für eine zeitnahe Transmitterrückführung sorgen, während EAAT1 und EAAT2 eher verzögert den Transmitter bereitstellen können.

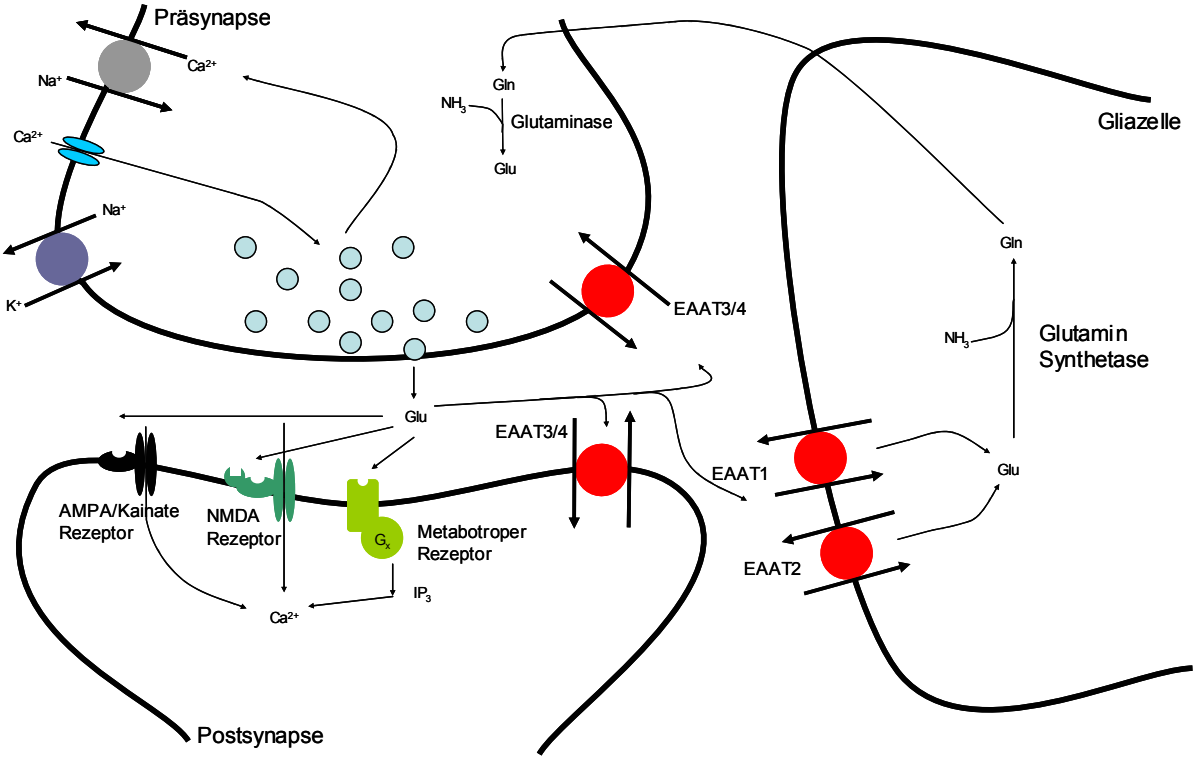

Abbildung 7: Funktion einer glutamatergen Synapse:
Glutamat wird in kalziumabhängiger Weise aus der Präsynapse in den synaptischen Spalt abgegeben und aktiviert an der Postsynapse ionotrope und metabotrope Glutamatrezeptoren. Die neuronalen EAAT3 und 4 führen das ausgeschüttete Glutamat rasch in die Präsynapse zurück. Glutamat, das glial über EAAT 1und 2 aufgenommen wurde, wird zu Glutamin umgewandelt, das selbst keine exzitatorische Wirkung besitzt und in das präsynaptische Neuron rückgeführt. Dort wird über das nur neuronal vorkommende Enzym Glutaminase Glutamin zu Glutamat umgewandelt.

1.2.6 Störungen der glutamatergen Neurotransmission und der EAAT

Fehlfunktionen der glutamatergen Neurotransmission wurden bei zahlreichen neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen gefunden.

Im Zusammenhang mit der Alzheimer Erkrankung wurde von Marangos et al. 1987 herausgefunden, dass Zelluntergang infolge von übermäßiger Glutamatfreisetzung zur Alzheimersymptomatik führt [4, 75].

Die Chorea Huntington äußert sich durch verminderte Glutamat- und GABA-Spiegel im Striatum und Nucleus caudatus [88, 94]. Eine mögliche Erklärung für diesen Umstand ist der Ausfall der Rückaufnahme von freigesetztem Glutamat aus der Synapse. Diese Annahme wurde von Cross et al. gestützt, der in post mortem Autopsie-Studien von Chorea Huntington-Patienten eine starke Reduktion von Glutamatrückaufnahme-Stellen fand [25].

Die infaust verlaufende neurologische Erkrankung Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) wird durch die Degeneration des 1. und 2. Motoneurons verursacht. Trotz vieler unterschiedlicher Hypothesen über die Pathogenese der ALS, ist man in jüngster Vergangenheit zu dem Schluss gekommen, dass die Neurodegeneration der Motoneurone durch Anstieg des glutamatergen Systems zustande kommt. Dieser Anstieg ist fast ausschließlich auf eine Fehlfunktion des EAAT2 (GLT1) zurückzuführen, wobei die Expression des Transporterproteins bei ALS-Patienten vermindert ist [103], trotz normaler mRNA-Konzentrationen. Daher vermuten einige Autoren eine Störung in (post-) Translations-Prozessen des EAAT2 [13]. Eine mögliche Erklärung dafür liefern Studien, die die Beteiligung der Cu/Zn Superoxid-Dismutase (SOD-1) an der familiären Form der ALS beschreiben [98]. Diese Mutation führt zur verminderten Abwehr von freien Radikalen im Gehirn, die möglicherweise die Proteinfunktion des EAAT2 stören.

Neben der Alzheimer-Demenz, der Chorea Huntington und der ALS führt man heutzutage auch die Parkinson-Erkrankung auf veränderte Glutamat-konzentrationen zurück. Es wird jedoch vermutet, dass weniger eine veränderte Transportfunktion als viel mehr veränderte Stoffwechselbedingungen zu diesem Glutamatanstieg führen [16].

1.3 Serum- und Glukokortikoid-induzierte Kinase

Die Serum- und Glukokortikoid-induzierte Kinase (SGK) konnte 1993 von Firestone et al. als weiteres Mitglied der Familie der Serin/Threonin Protein Kinasen aus Rattentumorzellen kloniert werden. Die SGK wurde als ein primäres Responsgen („immediate gene“) beschrieben, das transkriptionell durch Serum und Glukokortikoide hochreguliert wird [134]. Kurze Zeit später wurde die humane homologe hSGK bei der Suche nach zellvolumensensitiven Transkripten gefunden [26, 126, 129]. Mittlerweile konnten neben Serum und Glukokortikoiden zusätzlich zahlreiche andere Signalwege und Faktoren gefunden werden, die zur Regulation der SGK beitragen.

1.3.1 Einteilung der hSGK innerhalb der Proteinkinasen

Extrazelluläre Stimuli auf eine Zelle werden über intrazelluläre und membranständige Signalmechanismen weitergeleitet. Es resultiert ein komplexes Zusammenspiel aus Phospholipasen, Phosphatasen und Proteinkinasen. Dabei bewirkt die Proteinkinase die Anknüpfung eines Phosphatrestes an eine Aminosäure (Serin, Threonin, Tyrosin) des Zielproteins und erwirkt damit über eine lokale Ladungsänderung eine Konformationsänderung, Änderung von Affinität oder eine Freigabe von Bindungsstellen.

Die hSGK gehört zu den Serin/Threonin Kinasen. Das entsprechende Gen wird zur Gruppe der primären Responsgene („immediate early genes“) gezählt [127]. Es kodiert ein Protein von 49kD. In der katalytischen Domäne hat das hSGK-Protein 45%-55% Sequenzhomologie zu anderen Proteinenkinasen, wie rac-Proteinkinase, Proteinkinase A, B oder C und andere [85, 128, 134]. Extrakatalytische Proteinregionen hingegen weisen zu keiner bekannten Proteinkinase oder Protein Sequenzübereinstimmungen auf.

1.3.2 Isoformen und Gewebeverteilung

Bislang konnten drei Isoformen der hSGK kloniert werden; hSGK1, hSGK2 und hSGK3. Die Aminosäurensequenzen der katalytischen Domänen zeigen untereinander eine Sequenzhomologie von 80%, die nicht-katalytischen Regionen nur von circa 44-68%. Die N-terminalen Regionen sind praktisch nicht homolog [64]. Die Molekulargewichte betragen 49kD für hSGK1und für hSGK3 sowie für hSGK2 41.1 bzw. 47,5kD [64].
Die verschiedenen Isoformen der hSGK unterscheiden sich in ihrer Gewebeverteilung. Während hSGK1 und hSGK3 in fast allen Geweben, darunter auch im Gehirn vorkommen [64], ist die Verteilung der hSGK2 spezifischer und beschränkt sich vor allem auf die Epithelzellen der Leber und Niere, auf das Pankreas und auf das Gehirn [63, 64, 126]. Das hSGK1 Gen ist auf Chromosom 6, hSGK2 auf Chromosom 20 und hSGK3 auf Chromosom 8 lokalisiert [26, 128].

1.3.3 Regulation der SGK

Während die katalytische Aktivität der meisten bisher bekannten Proteinkinasen auf posttranskriptioneller Ebene reguliert wird, werden die Serin/Threonin Proteinkinasen hauptsächlich auf der Transkriptionsebene beeinflusst [129]. Daneben existieren noch zwei weitere Regulationsmechanismen. Die hSGK-Aktivität kann also über 3 unterschiedliche Wege reguliert werden kann.

Transkription

Von größter Bedeutung ist wie oben erwähnt die transkriptionelle Regulation durch verschiedene hormonelle und nicht-hormonelle Signale. Hormonelle Stimuli sind unter anderem Glukokortikoide, Mineralokortikoide, ADH, FSH und LH. Darüber hinaus können TNF-α, Thrombin, ein erhöhter intrazellulärer Kalziumspiegel, Hyper- und Hypotonizität der Umgebung, Zellschrumpfung und

Zellschwellung die hSGK-Transkription steigern [11, 19]. In Makrophagen sind die Zytokine TGF-β1 und Interleukin-4 als Transkriptionsinduktoren identifiziert worden [26, 127]. Interessant für diese Arbeit ist zudem, dass Neuronenverletzungen auch zu erhöhten hSGK1-Konzentrationen führen [38, 63, 129].
Schon Minuten nach den oben genannten Stimuli kommt es zur hSGK-Transkription („immediate early gene“). Die Halbwertszeit der SGK ist nur sehr kurz. Daher liegt das Konzentrationsmaximum nach hSGK-Stimulation schon nach 2 Stunden vor [12].

Regulation der katalytischen Aktivität

Die zweite Ebene der SGK-Aktivitätsregulation ist die posttranskriptionelle Ebene. Dabei verlangt die hSGK-Aktivierung zwei Phosphorylierungen an unterschiedlichen Stellen. Bei der hSGK1 sind dies die Aminosäuren Thr^{256} und Ser^{422}. Diese Phosphorylierungen werden durch die 3-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase1 (PDK1) und 2 (PDK2) durchgeführt, welche ihrerseits von einer Phosphorylierung durch Phosphoinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) aktiviert werden [40]. Die PI3-Kinase-Kaskade wird durch Insulin, IGF-1, oxidativen Stress, FSH und Glukokortikoide stimuliert [40]. Zuerst kommt es bei der PDK-Aktivierung zur Phosphorylierung des Ser^{422}, was durch Wortmanin, ein Inhibitor des PI-3-Kinase Signalwegs, inhibierbar ist. Durch die erste Phosphorylierung ermöglicht, kommt es dann zur Phosphorylierung an Thr^{256}, was letztlich die SGK aktiviert [63, 84, 87].
Ein weiterer Aktivierungsweg läuft über die „extracellular signal-regulated protein-kinase“ (ERK5), die ein Mitglied der MAP-Kinase-Familie ist. Diese Aktivierung ist jedoch unabhängig von der Phosphorylierung an Thr^{256}[47].

Regulation über die Kontrolle der subzellulären Lokalisation

Als dritte Form der SGK-Regulation gilt die Kontrolle über die subzelluläre Lokalisation. Tatsächlich zeigt eine Zelle in der Proliferationsphase eine überwiegende SGK-Lokalisation im Nukleus. Mit Einwirkung von Glukokortikoiden kommt es zum Stopp des Zellzyklus in der G1-Phase und einer vorwiegend zytoplasmatischen SGK-Lokalisation. Das bedeutet, dass

stress-induzierte Zellen vorwiegend enzymatisch aktivierte SGK im Zytoplasma besitzen. Eine wichtige Rolle spielen hier der Importin-α und Importin-β – Rezeptor [8].

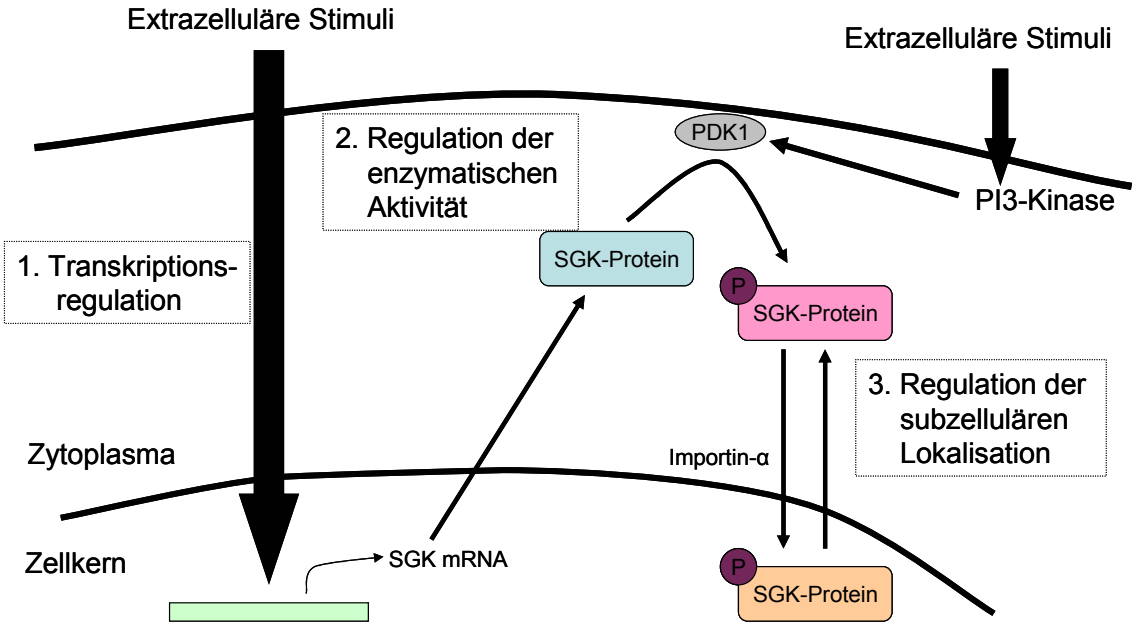

Abbildung 8: Regulation der hSGK

1.3.4 Interaktion der SGK mit anderen Proteinen

Wie in Kapitel 1.2.2 schon erwähnt, ist für eine mögliche Interaktion der SGK mit dem potentiellen Zielprotein eine SGK-Phosphorylierungs-Sequenz nötig. Es konnte jedoch in letzter Zeit gezeigt werden, dass auch Proteine ohne diese Sequenz von SGK reguliert werden [82]. Über die Art und Weise dieser Regulation kann bis heute keine genaue Aussage gemacht werden. Nicht auszuschließen ist die Annahme, dass SGK auf sein Zielprotein nicht direkt Einfluss nimmt, sondern vielmehr mit dritten Proteinen interagiert, die ihrerseits das Targetprotein regulieren [86].

Dieses Modell wurde für den intestinalen Phosphattransporter NaPiIIb (mit Nedd4-2 [82]) und für den Kaliumkanal ROMK1 (mit NHERF [139]) gezeigt.

NaPiIIb besitzt keine SGK-Phosphorylierungs-Sequenz. Er wird jedoch trotzdem durch SGK stimuliert. Gleichzeitig zeigt sich bei den Experimenten aber auch eine Verminderung der Phosphat-Transportaktivität des NaPiIIb durch Nedd4-2. Bekannt ist zudem, dass Nedd4-2 durch SGK in seiner Ubiquitinylierungsfähigkeit eingeschränkt wird [32]. Die stimulierende Wirkung der SGK auf NaPiIIb kann daher zumindest teilweise auf den inhibierenden Einfluss von SGK auf Nedd4-2 erklärt werden.

Bei Untersuchungen über die Interaktion von ROMK1 und SGK zeigte sich, dass die Expression von ROMK1 und SGK zu keinerlei Veränderungen des ROMK1-Stroms führt. Auch eine Koexpression von ROMK1 und NHERF2 führt zu keiner Veränderung des Stroms. Wird aber ROMK1, SGK und NHERF2 koexprimiert, so ergibt sich eine Steigerung der Stroms auf den zweifachen Wert.

Diese Untersuchungen zeigen, dass eine Regulation von Proteinen durch SGK nicht zwangsläufig durch eine direkte Interaktion dieser beiden Proteine verursacht wird. Möglich ist auch ein komplexerer Mechanismuns über zwischenagierende Proteine, von denen nun folgend zwei näher erläutert werden.

Nedd4-2

Nedd4-2 (Neural precursor cell expressed, developmentally downregulated gene) ist eine Ubiquitinligase und knüpft Ubiquitin an Proteine, die damit für den Abbau markiert werden. Die Bindung von Ubiquitin an Proteine des Zytoplasmas oder der Zellmembran, markiert diese zur Internalisierung und Degradierung durch Proteasomen [1].

Für diesen Vorgang muss Nedd4-2 über eine spezifische Bindungsstelle an das Zielprotein binden. Die spezifische Bindungsstelle heißt PY-Motiv und ist eine Prolin-reiche Aminosäuresequenz. Das PY-Motiv besteht aus Pro-Pro-Xxx-Tyr (Xxx kann eine beliebige Aminosäure sein) [3]. Inzwischen sind jedoch weitere Sequenzen bekannt, über die Nedd4-2 eine Ubiquitinierung vermitteln kann (Pro-Xxx-Pro-Pro-Tyr; Pro-Pro-Leu-Pro: pS/pT) [56, 60].

Bei Untersuchungen von Nedd4-2 und dem epithelialen Natriumkanal ENaC, zeigte sich, dass Nedd4-2 durch Ubiquitinierung ENaC hemmt [6, 57]. Diese Hemmung wird in Oozyten durch Koexpression von hSGK aufgehoben. hSGK phosphoryliert dabei Nedd4-2 an Ser444. Damit inaktiviert sie das Nedd4-2 Protein aber nicht vollständig, sondern führt lediglich zu einer Einschränkung der Fähigkeit zur Ubiquitinierung. Somit besteht zwischen Nedd4-2 und SGK eine direkte Interaktion und Regulation.

NHERF

NHERF (Natrium-Hydrogen-Exchanger Regulating Factor) wurde als Protein entdeckt, das die Phosphorylierung und Regulation des Na^+/H^+-Austauschers (NHE) durch PKA vermittelt [135, 140]. NHERF1 und NHERF2 zeigen 62% Sequenzhomologie und beide besitzen zwei Tandem PDZ-Domänen, die als Bindungssequenzen zwischen interagierenden Proteinen charakterisiert werden konnten. Am Beispiel des NHE konnte gezeigt werden, dass die Regulation des NHE zum einen NHERF benötigt und zum anderen durch SGK vermittelt ist. Dabei interagiert die zweite PDZ-Domäne des NHERF mit dem C-Terminus der SGK [138].

Interessanterweise konnten auch andere Proteine identifiziert werden, die mit NHERF interagieren. Darunter sind der Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CTFR), Platelet-derived Growth Factor und der Chlorid/Bikarbonat Austauscher des Darms [137].

Auch EAAT5 besitzt eine PDZ-Domäne und wird deshalb auf eine mögliche Interaktion mit NHERF2 getestet werden.

1.3.5 Die physiologische Funktion der hSGK

hSGK phosphoryliert, wie auch die anderen Serin/Threonin Kinasen (z.B. PKB) die Aminosäuren Serin und Threonin, wenn diese in einer Arg-Xxx-Arg-Xxx-Xxx-Ser/Thr Sequenz liegen [63, 64]. Diese Domäne wird auch SGK-

Phosphorylierungs-Site genannt. Es konnten jedoch auch Proteine ohne diese Site identifiziert werden, die trotzdem durch die hSGK reguliert werden [82].
Zu den Transportern und Kanälen, die durch die hSGK reguliert werden, gehören ENaC [19, 130], SCN5A [36], ROMK1 [83], Kv1.3 [49] und KCNE1/KCNQ1 [36] sowie CFTR [67].
Auch in der Regulation von Apoptose und Zellproliferation scheint die SGK eine Rolle zu spielen. Sie vemittelt dort die antiapoptotische Wirkung von Glukokortikoiden [14, 70, 78].

1.4 Fragestellung der Arbeit

2001 konnte Gamboa et al. zeigen, dass die Oberflächenexpression des EAAT1 (GLAST) durch insulin like growth factor stimuliert wird. Dieser Stimulation liegt ein PI3-Kinase Signalweg zugrunde [42], dem auch die hSGK als Komponente angehört (siehe Kapitel1.3.3).
In der vorliegenden Arbeit soll nun mit Hilfe überwiegend elektrophysiologischer Messungen der Beitrag der Serum- und Glukokortikoid-induzierbaren Kinase SGK und ihrer Isoformen sowie von weiteren interagierenden Proteinen, wie Nedd4-2 und NHERF2, an der Regulation des Glutamattransports der EAAT näher untersucht werden.

Genauer formuliert stehen folgende Fragen zur Beantwortung:

1. Nimmt die SGK an der Regulation des EAAT-Transports teil?
2. Kann SGK die EAAT direkt regulieren oder sind dabei dritte, interagierende Proteine beteiligt, wie die Ubiquitinligase Nedd4-2, NHERF oder GTRAP48?

3. Erfolgt die Regulation der EAAT über eine Veränderung der Transporterkinetik oder über Veränderungen im Trafficking, d.h. der Lokalisation und Verankerung des Transporters in der Zellmembran?

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Lösungen und Substanzen

OR-2

Die OR-2 Lösung wurde als Grundlösung bei der Oozytenpräparation und Kollagenisierung verwendet. Sie ist Ca^{2+}-frei und verbessert damit die Kollagenasewirkung, beziehungsweise stoppt diese nicht.

Substanz	Konzentration [mM]
NaCl	82,5
KCl	2,5
$MgCl_2$	1
Tris-Hepes	5

Tabelle 3: Zusammensetzung der OR-2, pH 7,8

Kollagenase

Je nach Aktivität wurden 1-3 g Kollagenase pro Liter OR-2 verwendet. Die entnommenen und zerkleinerten Ovarien wurden dann in der Kollagenase 1-2,5 Stunden behandelt, um bindegewebige Anteile von den Oozyten zu entfernen.

ND 96

ND 96 diente als Grundlösung für alle Versuche

Substanz	Konzentration [mM]
NaCl	96
KCl	2
$CaCl_2$	1,8
$MgCl_2$	1
Tris-Hepes	5

Tabelle 4: Zusammensetzung der ND 96, pH 7,4

Aufbewahrungslösung der Oozyten

Nach der Kollagenisierung wurden die Oozyten darin aufbewahrt. Die Lösung entspricht der ND 96 mit Gentamycin (Abwehr von Infektionen), Theophyllin (Verhinderung der weiteren Reifung) sowie Natriumpyruvat (Ernährung) der Oozyten.

Substanz	Konzentration [mM]
NaCl	96
KCl	2
$CaCl_2$	1,8
$MgCl_2$	1
Tris-Hepes	5
Natriumpyruvat	2,5
Theophyllin	0,5
Gentamycin	50 µg/l

Tabelle 5: Zusammensetzung der Aufbewahrungslösung, pH 7,4, Osmolarität 200 mOsm

Messlösungen

ND 96 basierte für die Messlösungen als Grundlösung. Es wurde Mononatriumglutamat der Firma SIGMA-ALDRICH aus Steinheim hinzugefügt, so dass eine Konzentration von 1mM erreicht wurde. Die Messlösung wurde mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 titriert.

Phosphat-Puffer-Kochsalzlösung (PBS)

Die PBS ist eine Standardlösung und wurde bei den immunhistochemischen Experimenten als Grundlösung und Waschlösung verwendet.

Substanz	Konzentration [mM]
NaCl	140
KCl	3
$NaPO_4$	10
KPO_4	2

Tabelle 6: Zusammensetzung der PBS

2.2 Oozyten als Expressionssystem

Seit vielen Jahren sind die Oozyten des südafrikanischen Krallenfroschs *Xenopus laevis* zu Forschungszwecken in Laboratorien geschätzt und genutzt. Ursprünglich ein diagnostisches Mittel bei Schwangerschaftstests, [45] werden heute Xenopus laevis Oozyten als Modellsystem zur Expression heterologer RNA verwendet [30, 31, 46].

Viele positive Eigenschaften machen den *Xenopus laevis* zu einem geeigneten Labortier. So ist er ohne viel Aufwand in einem Aquarium zu halten, einfach zu narkotisieren und zur Oozytenentnahme leicht zu operieren.

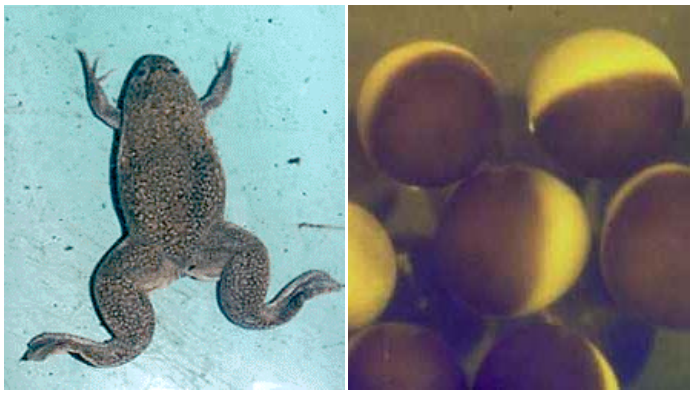

Abbildung 9: *Xenopus laevis* und Oozyten des Froschs

Die Oozyten sind von vier Membranschichten umgeben. Durch den Einsatz von Kollagenase werden die drei äußeren entfernt. Damit verbleibt die innere Vitellinmembran (die Oozyte wird nun defollikulierte Oozyte genannt) [1, 29]. Man kann zwei unterschiedliche Hemisphären der Oozyten schon mit bloßem Auge erkennen:
Die animalische, die durch Einlagerung von Melaninpigment dunkel gefärbt ist. Sie enthält eine große Anzahl von Mikrovilli, viel endoplasmatisches Retikulum und viel Zytoskelett sowie eine hohe Dichte an kalziumabhängigen Chloridkanälen und an Kalziumkanälen.
Die vegetative Hemisphäre dagegen ist hell gefärbt, enthält mehr RNA und dient als Eintrittsort des Spermiums [29].

Xenopus laevis Oozyten besitzen eine ganze Reihe technischer Vorteile. Der sehr große Zelldurchmesser von 1,3 mm erleichtert die Handhabung und erlaubt die relativ problemlose cRNA-Injektion, sowie die spätere Einbringung von intrazellulären Glaskapillaren zur Messung [110, 124].
Ein Nachteil des Oozytenexpressionssystems ist die Verschiedenheit zu mammalischen Zellen. Posttranslationäre Vorgänge müssen in *Xenopus Oozyten* nicht zwangsläufig gleich verlaufen wie in mammalischen Zellen. Für viele Neurotransmittersysteme und Ionenkanäle konnte allerdings gezeigt werden, dass sie ihre natürlichen Eigenschaften auch bei Expression in *Xenopus laevis* Oozyten beibehalten [29].
Teilweise kommt erschwerend hinzu, dass second-messenger Systeme in *Xenopus Oozyten* eventuell von second-messenger Systemen der Säugerzelle

abweichen können. Eine mögliche Regulation von Proteinen im Expressionssystem könnte deshalb gar nicht möglich sein und macht eine Übertragung auf Säugerzellen schwierig. Auf die Bedeutung der Probleme der *Xenopus laevis* Oozyten als Expressionssystem wird in der Diskussion später nochmals näher eingegangen.

Zur sinnvollen Beurteilung der Ergebnisse ist eine Berücksichtigung der endogenen Kanäle und Transportsysteme erforderlich, da endogene Transportaktivitäten oder Leitfähigkeiten sich bei Messungen mit den induzierten Ereignissen überlagern und damit das Ergebnis verfälschen können. Generell kann man aber sagen, dass endogene Kanäle und Transporter nicht sehr ausgeprägt sind. Zudem existieren in *Xenopus laevis* Oozyten keine intrinsischen Glutamattransportsysteme.

	Konzentration intrazellulär [mM]
Na^+	4-23
K^+	76-148
Cl^-	24-62
Ca^{2+}	3-100 x 10^{-6}

Tabelle 7: Intrazelluläre Ionenkonzentration in Xenopus Oozyten

2.2.1 Oozytenpräparation

Die Ovarien eines ausgewachsenen Xenopus-Weibchens enthalten über 30.000 reife Oozyten. Deshalb genügt es, nur einen Teil des Ovars zu entnehmen. Dazu wurde das Weibchen für 15-20 min in 0,1%iger 3-Aminobenzoesäureethylester-Lösung (Sigma, Taufkirchen) anästhesiert. Danach wurde der Frosch - auf dem Rücken liegend - auf Eis gelagert und die Bauchhaut desinfiziert. Unter semisterilen Bedingungen wurde quer oberhalb der linken oder rechten Inguinalfalte eine 0,5-1 cm lange Stichinzision der Haut durchgeführt und anschließend der Muskel durchtrennt. Die Ovarialsäcke lagen dann sichtbar in der Bauchhöhle und konnten mit Pinzette und Schere scharf

herausgetrennt werden. Sowohl der Muskelschnitt, als auch die Hautinzision wurden nacheinander mit resorbierbarem Nahtmaterial (Ethicon Vicryl, Polyglactin, ungefärbt, geflochten, resorbierbar; [Firma Johnson&Johnson, Belgien]) verschlossen. Nach Beendigung der Operation wurde der Frosch unmittelbar zum Erwachen zurück in seinen Behälter gesetzt, der aber nur so wenig Wasser enthielt, dass der Frosch zwar im Wasser lag, aber nicht ertrinken konnte. Dort erwachte der Frosch dann aus seiner Anästhesie und wurde erst dann zurück in sein Aquarium gesetzt, wenn er adäquat auf äußere Reize durch Bewegungen reagieren konnte.

In seinem Aquarium verblieb er bis zur nächsten Operation, die nicht vor Beendigung der vollständigen Heilung der Bauchnarbe durchgeführt wurde. Dabei kommt den *Xenopus* Fröschen zu gute, dass sie antimikrobielle Peptide absondern, die eine hervorragende Wundheilung ermöglichen [10].

Die entnommenen Ovarialsäcke wurden anschließend in OR-2 Lösung gelagert und mit einer Pinzette in kleine Einheiten zerkleinert, um den späteren Kollagenaseverdau zu erleichtern. Zur weiteren Defollikulierung wurden die Oozyten 60-150min mit Kollagenase A (1-3g) in OR-2 unter ständiger Bewegung denudifiziert. Dieser Vorgang wurde dann beendet, wenn die Oozyten überwiegend einzeln und ohne sichtbare Bindegewebe und Gefäße waren. Zur Beendigung des Kollagenaseverdaus wurden die Oozyten mehrfach mit ND 96 gespült.

Anschließend konnte man die Oozyten unter dem Binokular nach Vitalitätszustand und Reifegrad sortieren. Als Suchkriterien wurden ein Reifegrad Stadium V und VI, eine klare Trennung zwischen Animal- und Vegetalpol und das Fehlen von Aufhellungen beziehungsweise von dunklen Flecken der Pole angewandt. Die somit aussortierten Zellen wurden in kleinen Gruppen zu jeweils circa 30 Zellen in Petrischalen mit ND 96-Aufbewahrungs-lösung bei 15-17°C bis zur weiteren Verarbeitung am nächsten Tag gelagert.

2.2.2 cRNA-Synthese und -Injektion

Die Transfektion der cDNA in E.coli (Stamm DH5α) führte zur Vermehrung der cDNA [22, 104]. Eine Kolonie auf der Agarplatte wurde am zweiten Tag in eine Flüssigkultur überführt. Am darauf folgenden Tag wurde der Erfolg der Transfektion durch Minipräparation dieser Flüssigkultur kontrolliert und dann mittels Maxipräparation die Plasmid-DNA gewonnen. Die Plasmid-DNA konnte dann durch die in der **Tabelle 8** aufgeführten Restriktionsenzyme am 3´-Ende des Inserts geschnitten und damit linearisiert werden. Die cRNA wurde mittels reverser Transkription und Restriktionsverdau durch die entsprechende Polymerase aus der linearisierten Plasmid-DNA hergestellt. Die Stocklösung der cRNA wurde bei -80°C aufbewahrt und bei Bedarf aufgetaut und auf die notwendige Endkonzentration verdünnt.

Transporter	Herkunft des cDNA-Klons	Vektor	Restriktions-enzym zur Linearisierung	Polymerase
EAAT1	Wendy Fairman, Portland,	pOTV	Not1	T7
EAAT2	Wendy Fairman, Portland	pOTV	Not1	T7
EAAT3	Angela Steel, Boston Harvard	pSPORT	SPE1	T7
EAAT4	Wendy Fairman, Portland	pOTV	Not1	T7

Tabelle 8: Verwendete Vektoren, Restriktionsenzme und Polymerasen bei Herstellung der cRNA

Zur Injektion wurden Borosilikatglaskapillaren (Fa. WPI, Berlin) mit einem Außendurchmesser von 1,2 mm mit einem Mikroelektrodenpuller (DMZ Universal-Puller der Firma Zeitz, Augsburg) so gezogen, dass die Glaskapillare

eine sehr lange und dünne Spitze hatte. Nachdem diese Spitze unter dem Binokular so abgebrochen wurde, dass die Nadelspitze einen Öffnungsdurchmesser von 20-40 µm hatte, wurde die Glaskapillare mit Paraffinöl gefüllt, um sie luftfrei zu machen. Dann konnte die cRNA Lösung (verdünnt mit DEPC Wasser) mit Hilfe des Mikroinjektors aufgezogen werden. Die am Vortag präparierten Oozyten wurden in einer Petrischale mit Polypropylnetz am Boden angeordnet. Dabei verhinderte das Polypropylnetz ein Verrutschen der Oozyte während des Injektionsvorgangs. Die Petrischale war mit der Aufbewahrungslösung gefüllt. Die eigentliche Injektion konnte jetzt beginnen, indem die Glaskapillare mit ihrer Spitze durch die Membran in das Zytoplasma eingebracht wurde. Dann wurden 25nl cRNA in die Zelle injiziert. Die benutzten Konzentrationen der cRNA sind in **Tabelle 9** aufgeführt.

cRNA	Konzentration der injizierten RNA	Menge der injizierten cRNA pro Zelle
Kinasen	300 ng/µl	7,5 ng
Nedd4-2	300 ng/µl	7,5 ng
NHERF2	300 ng/µl	7,5 ng
GTRAP 48	300 ng/µl	7,5 ng
EAAT1/3	40 ng/µl	1,0 ng
EAAT2	20 ng/µl	0,5 ng
EAAT5	1000 ng/µl	25,0 ng

Tabelle 9: Konzentrationen und Mengen der injizierten cRNA

Alle Injektionschritte wurden unter semisterilen Bedingungen durchgeführt, um ein Kontamination mit RNAasen zu vermeiden.
Bei Versuchen mit Expression mehrerer Proteine wurden die einzelnen cRNA´s nacheinander mit einem Abstand von 1-2 Stunden injiziert. Um dabei Volumenunterschiede und eventuell Beeinflussung von volumensensitiven Kanälen zu vermeiden, wurde die differierende Menge an Volumen durch Injektion von DEPC Wasser ausgeglichen.

Die cRNA´s der Kinasen und Regulatorproteine wurden am ersten Tag und die cRNA der Transporter am zweiten Tag nach Oozytenpräparation injiziert.
Die Messung erfolgte nach 4-6 Tagen. Bis dahin wurden die Zellen bei 15-17°C in der Aufbewahrungslösung gehalten und ständig auf Vitalität geprüft. Avitale Oozyten wurden beim täglichen Mediumwechsel aussortiert.

2.3 Elektrophysiologische Methoden

2.3.1 Potentialmessung (current clamp)

Die Potentialmessung dient der Messung des Membranpotentials einer Zelle. Dazu wird die Potentialdifferenz einer intrazellulären Mikroelektrode gegenüber einer Referenzeletrode, im Bad liegend, ermittelt. Die Ag-$AgCl_2$ Referenzelektrode ist über eine Brücke aus 3% Agar und 3 M KCl-Lösung mit dem Bad verbunden [2, 109]. Die intrazelluläre Mikroelektrode ist eine mit einem Mikroelektrodenpuller (DMZ Universal-Puller der Firma Zeitz, Augsburg) gezogene Borosilikatglaskapillare (Typ GC150TF-15; 1,5 mm Außendurchmesser; 1,17 mm Innendurchmesser; mit Filament, Fa. Clark Elektromedical Instruments, Pangborne, GB). Sie wird mit 3 M KCl-Lösung gefüllt und ist über einen chlorierten Silberdraht mit dem Verstärker verbunden. Der Widerstand der Mikroelektroden wurde stets überprüft. Sie wurden bei Werten außerhalb 0,2-2MΩ ausgetauscht. Vor dem Einstechen der Mikroelektrode in die Oozyte wurde ein Nullabgleich mit der Referenz durchgeführt.

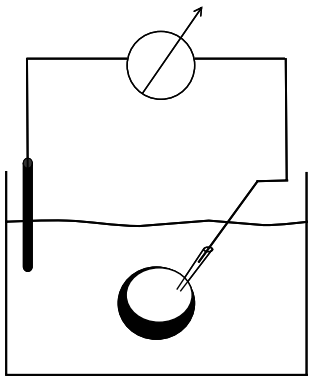

Abbildung 10:Versuchsaufbau der current-clamp-Methode

2.3.2 Spannungsklemme (Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp [TEVC])

Die TEVC-Methode ermöglicht unter Verwendung einer weiteren intrazellulären Mikroelektrode das Einstellen eines gewünschten Membranpotentials der *Xenopus laevis* Oozyte. Hierbei misst eine Spannungselektrode (E_V) das aktuelle Potential (V_M). Ein Rückkopplungsverstärker (FBA) (GeneClamp Amplifier, Axon Instruments) verstärkt und vergleicht V_M mit dem vom Experimentator gewünschten Haltemembranpotential (V_{hold}). Aus der Differenz von V_M - V_{hold} ergibt sich ein Strom (I_{hold}), der nötig ist, um das Haltepotential zu erreichen und konstant zu halten. Er wird über eine Stromelektrode appliziert, fließt über die Membran und kann durch die Badelektrode gemessen werden [1, 33, 50].

I_{hold} entspricht dem Ionenstrom durch die Oozytenmembran mit dem Membranwiderstand R_m bei einem entsprechenden Haltepotential V_{hold}. Dabei gilt das Ohm´sche Gesetz R=U/I. Per definitionem reflektiert ein negativer Strom einen Einstrom von positiven Ionen und umgekehrt.

Bei elektrogenen Transportvorgängen über die Membran verändert sich der Betrag des I_{hold}, der zur Aufrechterhaltung des Haltepotentials nötig ist. Diese Änderung wird als induzierter Strom gemessen und dient als Maß für den Membrantransport.

Die übrigen Messanordnungen entsprechen der Anordnung bei der Potentialmessung.

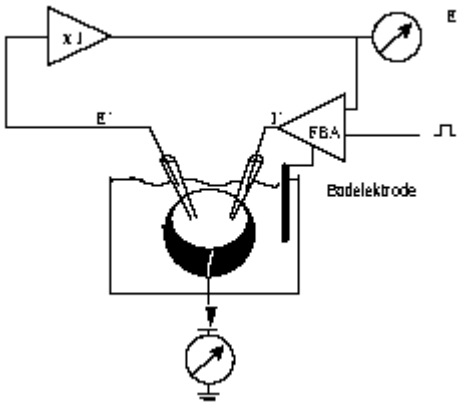

Abbildung 11: Versuchaufbau der Voltage-clamp Methode

2.3.3 Aufbau des Arbeitsplatzes für Voltage Clamp

Die Oozyte befand sich während des Experiments in einer speziell konstruierten Messkammer mit einem Füllungsvolumen von circa 3,5 ml, die kontinuierlich über eine Schwerkraftsuperfusion (Flussrate 20 ml/min) und eine Absaugpumpe mit Experimentierlösung durchspült wurde. Auf diese Weise konnte innerhalb von 10-15 Sekunden der Inhalt der Messkammer komplett ausgetauscht werden. Unter visueller Kontrolle durch eine Stereolupe wurden die Mikro-elektroden in die Zellen eingestochen.

2.3.4 Durchführung der Experimente

Alle Messungen wurden 4-6 Tage nach cRNA-Injektion bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Messung wurde mehrfach wiederholt, um Oozyten verschiedener Frösche zu messen. Dabei kam es zu keinen qualitativ

unterschiedlichen Ergebnissen. Teilweise variierte die Größe der Ströme von Batch zu Batch, wobei sich eine jahreszeitliche Abhängigkeit durchaus vermuten ließ. Die SGK-Aktivierung war jedoch unabhängig der Jahreszeit identisch.
Für alle Messungen wurde das Haltepotential auf -60 mV eingestellt.
Alle Daten wurden mit 10 Hz gefiltert und mit einer Aquisitionsrate von 10 Datenpunkten pro Sekunde über die Software pCLAMP9 (Axon Instruments) auf einen PC aufgezeichnet.

2.4 Auswertung und Statistik

Die Originalkurven wurden dann mittels der Software Clampfit analysiert und der Glutamat induzierte Einwärtsstrom I_{Glu} bestimmt. Dabei wurde I_{Glu} als die Differenz des Haltestroms bei ND 96 und des Haltestroms bei ND96 + 1mM Glutamat als Badlösung definiert.

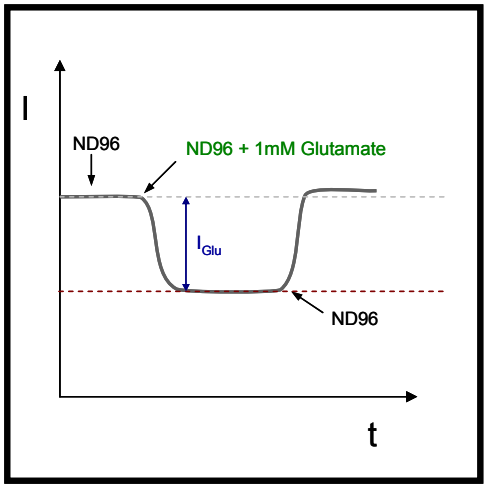

Abbildung 12: I_{Glu} berechnet sich aus der Differenz der Halteströme ohne und mit Glutamat

Von den Messdaten sind, wenn nicht anders beschrieben, arithmetischer Mittelwert und Standardfehler (SEM) bestimmt worden. „n“ gibt dabei die Anzahl voneinander unabhängiger Messungen, „N“ die Anzahl der verschiedenen Spendertiere an. Es wurden mindestens drei Batches mit Oozyten unterschiedlicher Frösche durchgeführt.

Die ermittelten Werte wurden mit Hilfe des ANOVA-Tests bei mehr als zwei zu vergleichenden Gruppen auf Signifikanz überprüft und nur Gruppen mit einem p-Wert < 0,05 als signifikant angesehen.
Wurden nur zwei Gruppen auf Signifikanz geprüft, so wurde der t-Test nach STUDENT verwendet. Auch hier wurden nur Gruppen, die einen p-Wert < 0,05 hatten als signifikant angesehen.
Signifikante Gruppen wurden mit einem Sonderzeichen gekennzeichnet.
Alle kinetischen Messdaten, die eine Konzentrations-Transport-Kurve ergeben, wurden mit der „Hill-Gleichung“ gefittet, die sich von der Michaelis-Menten-Gleichung ableiten lässt.

(1) Michaelis-Menten-Gleichung

$$I = \frac{I_{max} \times C}{K_m + C}$$

(2) Hill-Gleichung

$$I = \frac{I_{max} \times C^n}{K_m^n + C^n}$$

wobei:

	I	=	gemessener Strom
	I_{max}	=	maximaler Strom
	C	=	Substratkonzentration
	Km	=	Substratkonzentration bei halbmaximalem Strom
	n	=	Hillkoeffizient

2.5 Immunhistochemie

Die Experimente der Immunhistochemie wurden mit Brown Norway Ratten nach den Richtlinien des „ARVO Statement“ für die Benutzung von Tieren in der ophtalmologischen und Seh-Forschung und nach den Richtlinien der Ethikkommission der Universität Tübingen durchgeführt.
Die Ratten wurden unter striktem 12 Stunden Licht / 12 Stunden Dunkelheit Zyklus gehalten mit einer Beleuchtung von 10 Lux.

2.5.1 Gewebeentnahme und Präparation

Die Gewebeentnahme wurde an erwachsenen Ratten während der Lichtphase zwischen 9 und 15 Uhr durchgeführt. Dafür wurden die Ratten mit CO_2 getötet und dekapitiert. Die Augen wurden aus dem Schädel freipräpariert und der hintere Anteil in 4 %igem Formaldehyd in Phosphatpuffer (0.2 M NaH_2PO_4 /

Na_2HPO_4; pH 7.4) für 30min bei 4°C fixiert. Nach Waschen mit Phosphatpuffer wurden die Präparate durch eine Immersion in 30 %iger Sukrose über Nacht bei 4°C kältegeschützt gelagert. Dabei waren sie in Tek Gewebe (Leica, Nussloch, Germany) eingebettet.
Am nächsten Tag wurden vertikale Gefrierschnitte von 10 µm Dicke angefertigt und auf mit Gelatine beschichteten Glasträgern aufgezogen. Diese wurden für 3 Stunden getrocknet und dann bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

2.5.2 Immunhistochemische Verfahren

Um Hintergrundartefakte und -muster zu unterdrücken wurden die Schnitte für 30 Minuten in 20%igem Ziegenserum in Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) (Sigma, Taufkirchen, Germany) mit 0,1 % Triton X-100 (PBST) inkubiert.
Für die immunohistochemische Detektion der SGK wurde ein spezifisches polyklonales Antiserum verwendet [132]. Ein EAAT3-Antikörper wurde von der Firma Chemicon (Tamecula, CA) bezogen. Die Antikörper wurden in PBST dilutiert. Die Schnittpräparate wurden dann über Nacht bei 4°C in dieser Antikörperlösung inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Präparate für 1 Stunde in der Lösung mit den sekundären Antikörpern (konjugiert mit Alexa Fluor 488 oder Cy3) (Molecular Probes, Eugene, OR) inkubiert.
Die Doppel-Markierungs-Experimente, die die Kolokalisation von EAAT3 und SGK1 darstellen sollen, wurden durch gleichzeitigen Gebrauch von den primären Antikörpern durchgeführt. Die sekundären Antikörper gegen SGK1 und EAAT3 wurden kurze Zeit später zugegeben.
Alle Schnitte wurden mit PBS gespült und mit Glycerol gedeckt. Um die Spezifität der Antikörperreaktion zu beweisen, wurden negative Kontrollgruppen untersucht, bei denen das Ansetzen mit primären Antikörpern unterlassen wurde.
Alle histologischen und fotodokumentatorischen Untersuchungen wurden mit einem Olympus AX70 (Tokio, Japan) Mikroskop durchgeführt. Die Fotografien

wurden mit Adobe Photoshop (Mountain View, USA) digitalisiert und auf Helligkeit und der Kontrast bearbeitet.

Die immunhistochemischen Arbeiten wurden an der Forschungsstelle für Experimentelle Ophthalmologie im Labor von Herrn PD Dr. Konrad Kohler durchgeführt.

3. Versuche und Ergebnisse

3.1 Regulation des EAAT1

3.1.1 EAAT1 und hSGK

Die ersten Experimente wurden an sieben verschiedenen Oozytengruppen durchgeführt, die sich in ihrer jeweiligen Koinjektion unterschieden. wtEAAT1 cRNA wurde koinjiziert mit DEPC-Wasser, ^{S422D}SGK1, ^{K127N}SGK1, wtSGK1, wtSGK2, wtSGK3 und $^{T308D,\ S473D}$PKB cRNA.. Zur Kontrolle wurden auch Oozyten gemessen, die keine EAAT1 cRNA-Injektion erhielten.
Wie in der Einleitung schon beschrieben wird die SGK Aktivität durch PI3-Kinase abhängige Phosphorylierungen gesteuert. Phosphorylierung an Ser422 der hSGK1 oder an Thr308 und Ser473 der PKB führt zu einer Aktivierung dieser Kinasen. Ersetzt man diese Aminosäuren mit Aspartat, so simuliert dessen negative Ladung die Phosphorylierung und man erhält die permanent aktiven Mutanten ^{S422D}SGK1 und $^{T308D,\ S473D}$PKB. Demgegenüber ist bei der ^{K127N}SGK1 die katalytische Einheit durch das Ersetzen von Lys127 mit Asparagin zerschlagen, diese Mutante ist nicht aktiv. wtKinasen sind die natürlich vorkommenden Wildtyp Kinasen.

Die Injektion der EAAT1 cRNA führt zur Expression des EAAT1 Proteins und bei Zugabe von 1mM Glutamat zu einem Glutamat induzierten Einwärtsstrom.

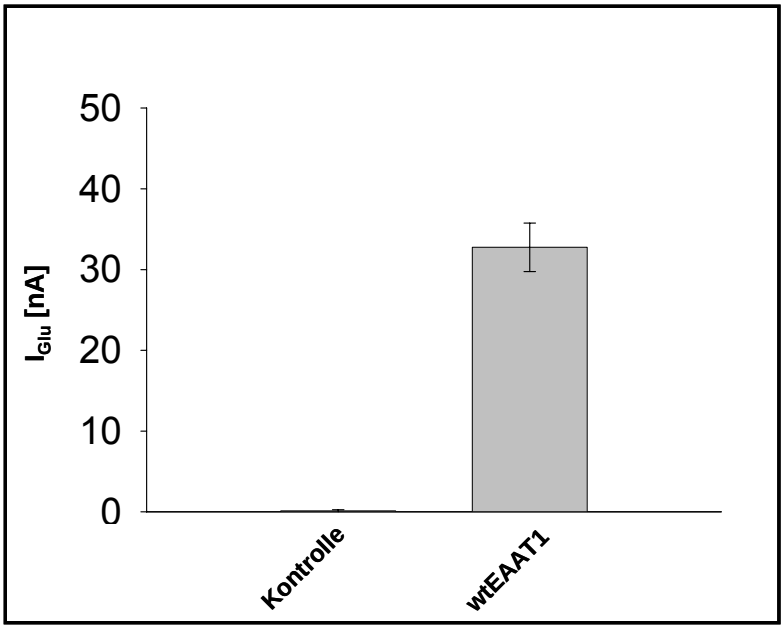

Abbildung 13: Die nicht EAAT1 injizierte Kontrollgruppe zeigt keinen Glutamat induzierten Einwärtsstrom

Die Koexpression von EAAT1 und ^{S422D}SGK1 vergrößert I_{Glu} signifikant, wohingegen ^{K127N}SGK1 nicht in der Lage ist, I_{Glu} zu beeinflussen.

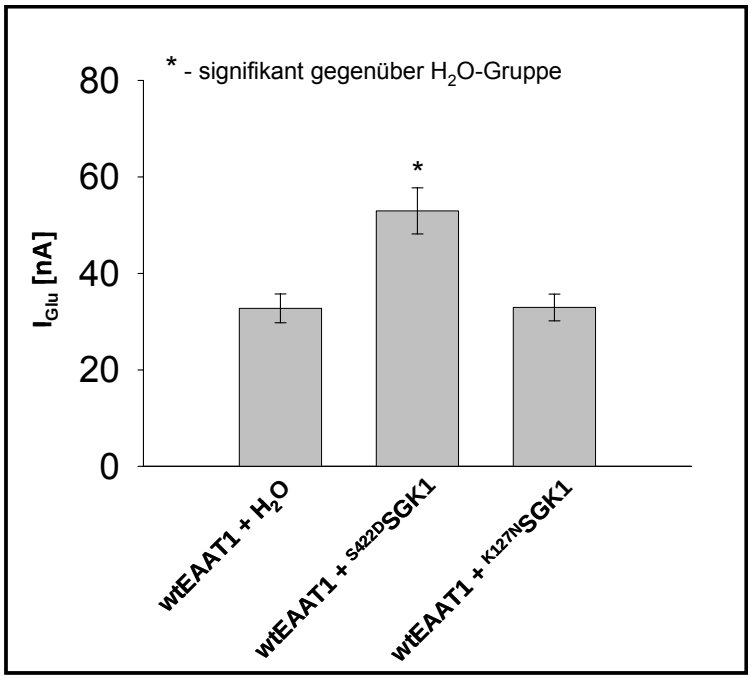

Abbildung 14: Koexpression des EAAT1 mit ^{S422D}SGK1 und ^{K127N}SGK1

In Oozyten, die SGK2 oder $^{T308D,\ S473D}$PKB exprimieren, lassen sich nur geringfügig und nicht signifikant höhere I_{Glu}-Werte in Bezug auf die DEPC-Wasser injizierten Zellen messen. SGK3 injizierte Zellen zeigen jedoch einen fast gleich hohen I_{Glu}-Wert als die ^{S422D}SGK1 injizierten Zellen.

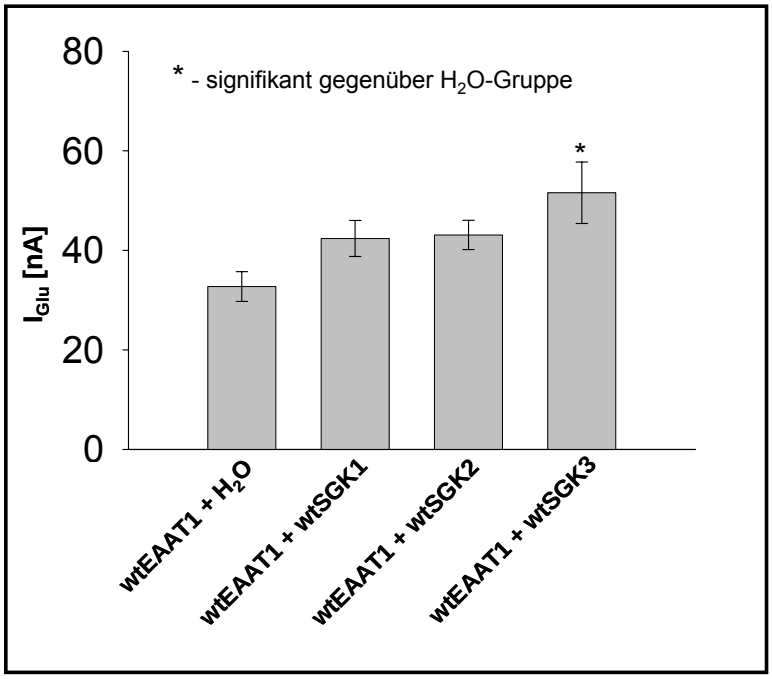

Abbildung 15: Ströme bei EAAT1 Koexpression mit wtSGK1, wtSGK2 und wtSGK3
Nur die wtSGK3 stimuliert den EAAT1 Transport

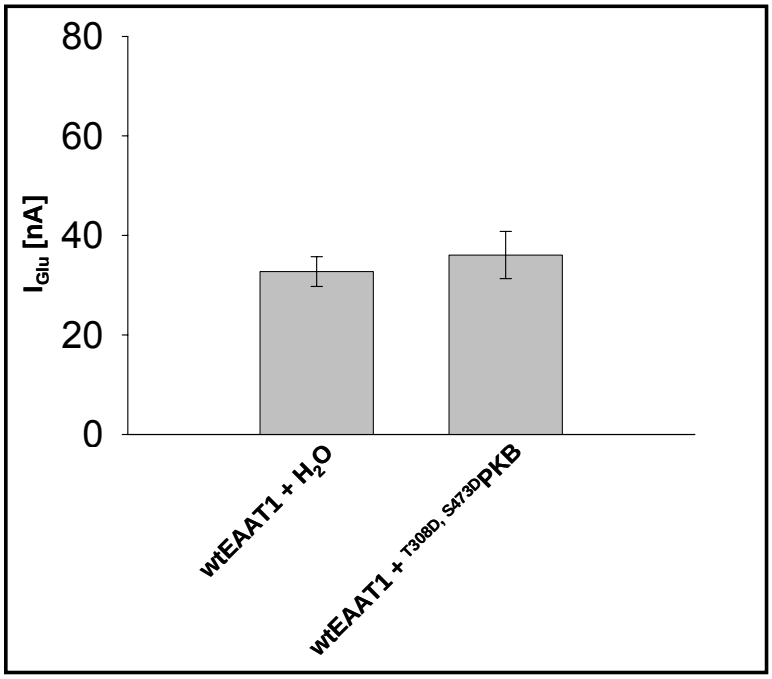

Abbildung 16: PKB kann den EAAT1 Glutamattransport nicht stimulieren

Expression	Arithmetisches Mittel ± Standardfehler	n
wtEAAT1 + H_2O	32,8 ± 3,0 nA	27
wtEAAT1 + ^{S422D}SGK1	52,9 ± 4,8 nA	27
wtEAAT1 + ^{K127N}SGK1	32,9 ± 2,8 nA	32
wtEAAT1 + wtSGK1	42,4 ± 3,6 nA	5
wtEAAT1 + wtSGK2	43,1 ± 3,0 nA	5
wtEAAT1 + wtSGK3	51,6 ± 6,2 nA	19
wtEAAT1 + $^{T308D, S473D}$PKB	36,1 ± 4,7 nA	19

Tabelle 10: Arithmetischer Mittelwert und Standardfehler

Der genaue Mechanismus der hSGK-Regulation von EAAT1 ist damit aber noch nicht geklärt. Wie in Kapitel 1.2.2 schon genauer erläutert, besitzt das EAAT1 Protein eine Aminosäuresequenz, an welcher hSGK bevorzugt phosphoryliert, die sogenannte SGK Phosphorylierungs-Site. In dieser Sequenz liegt die Aminosäure Thr482, die für weitere Untersuchungen zum einen durch Aspartat und zum anderen durch Asparagin ersetzt wurde. Voltage clamp

Messungen mit der ^{T482D}EAAT1 Mutante zeigen einen mehr als dreifach gesteigerten I_{Glu}. Bei dieser Mutante ist Thr482 durch Aspartat ersetzt, dessen negative Ladung eine Phosphorylierung an dieser Stelle simuliert. Die Transportrate des ^{T482D}EAAT1 kann durch zusätzliche Expression von ^{S422D}SGK1 nicht weiter stimuliert werden. Analog zeigt ^{T482A}EAAT1, hier ist Thr482 mit Asparagin ersetzt und damit ohne negative Ladung und nicht weiter phosphorylierbar durch SGK, einen I_{Glu}-Wert, der bei 10%-20% des Wertes des wtEAAT1 liegt. Auch hier führt eine Koexpression von ^{S422D}SGK1 zu keinem Anstieg des Einwärtsstroms.

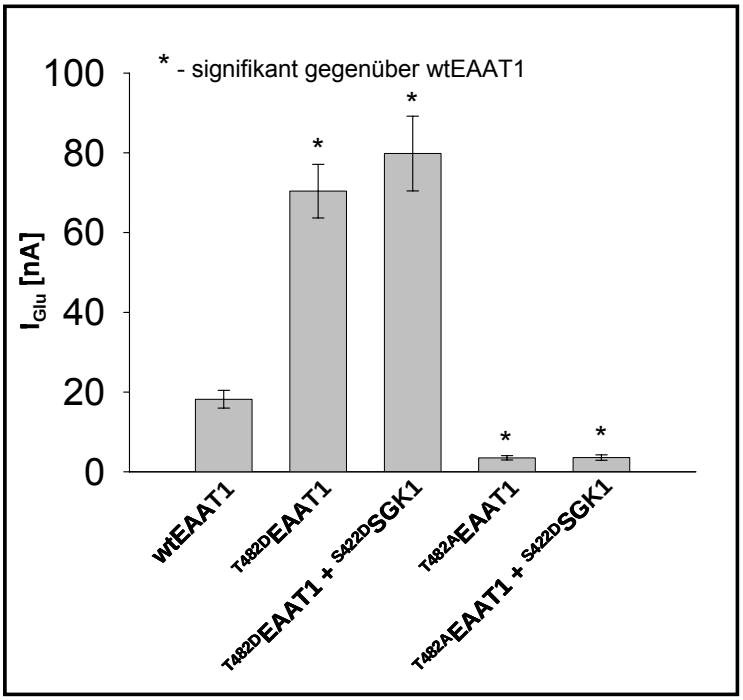

Abbildung 17: Austausch von Thr483 gegen Aspartat oder Asparagin

Expression	Arithmetisches Mittel ± Standardfehler	n
wtEAAT1 + H_2O	18,2 ± 2,2 nA	20
^{T482D}EAAT1 + H_2O	70,4 ± 6,7 nA	20
^{T482D}EAAT1 + ^{S422D}SGK1	79,8 ± 9,4 nA	20
^{T482A}EAAT1 + H_2O	3,5 ± 0,5 nA	20
^{T482A}EAAT1 + ^{S422D}SGK1	3,6 ± 0,7 nA	10

Tabelle 11: Arithmetischer Mittelwert und Standardfehler der EAAT1 Mutanten

3.1.2 Inhibition des EAAT1-Transports durch Nedd4-2

Nedd4-2 ist eine Ubiquitinligase, die Membranproteine durch Ubiquitinierung zur Degradation und zum Abbau markiert.
Tatsächlich wird I_{Glu} durch die Koexpression von Nedd4-2 signifikant verkleinert. Dieser Effekt kann durch Koexpression von ^{S422D}SGK1 aufgehoben werden, während ^{K127N}SGK1 den inhibitorischen Effekt des Nedd4-2 nicht beeinflusst.

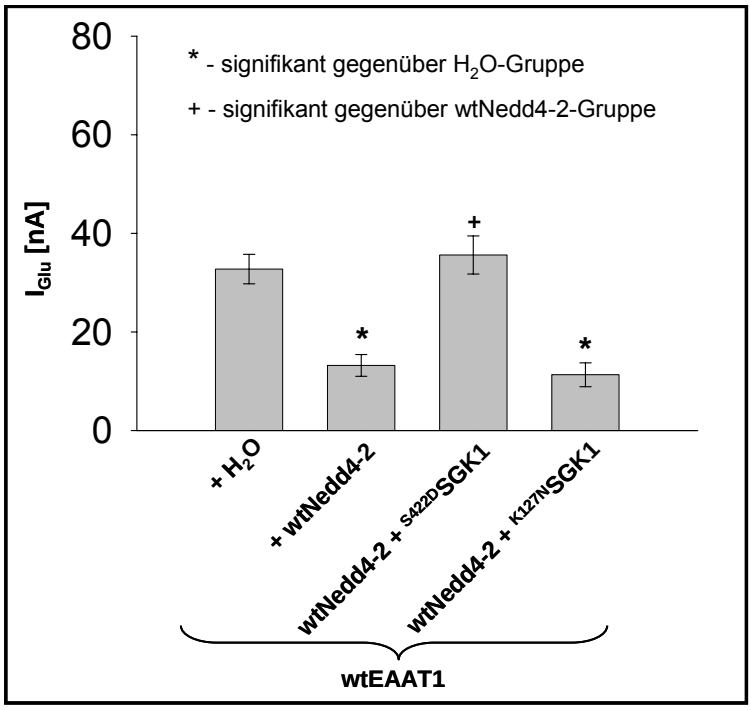

Abbildung 18: Inhibition von EAAT1 durch Nedd4-2
Nur ^{S422D}SGK1 kann den Nedd4-2 Effekt aufheben

Werden EAAT1 und Nedd4-2 injizierte Zellen mit wtSGK1 oder wtSGK2 koexprimiert, so ergeben sich keine Effekte auf die Inhibition des EAAT1-Transports durch Nedd4-2. I_{Glu} unterscheidet sich nicht signifikant. Anders jedoch bei wtSGK3; ähnlich wie bei der Koexpression von EAAT1/Nedd4-2 injizierten Zellen mit ^{S422D}SGK1 kommt es auch bei Koexpression mit wtSGK3 zu einer Aufhebung des inhibitorischen Effekts von Nedd4-2 auf EAAT1. ^{T308D,} ^{S473D}PKB ist nicht in der Lage den Nedd4-2 Effekt aufzuheben

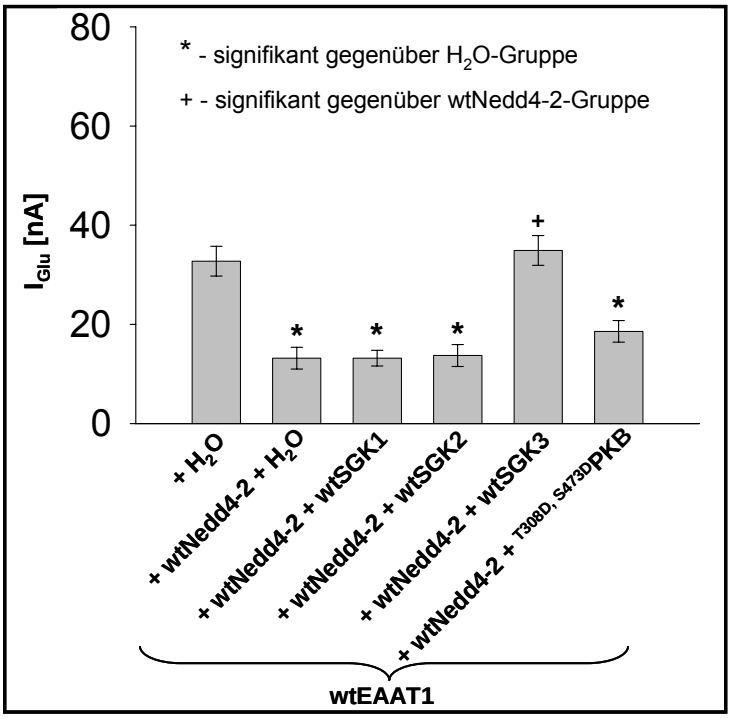

Abbildung 19: Beeinflussung des inhibitorischen Effekts von Nedd4-2 durch die verschiedenen Kinasen

Expression wtEAAT1	Arithmetisches Mittel ± Standardfehler	n
+ H_2O	32,7 ± 3,0 nA	27
+ wtNedd4-2 + H_2O	13,2 ± 2,2 nA	30
+ wtNedd4-2 + ^{S422D}SGK1	35,6 ± 3,9 nA	26
+ wtNedd4-2 + ^{K127N}SGK1	11,3 ± 2,4 nA	18
+ wtNedd4-2 + wtSGK1	13,2 ± 1,6 nA	15
+ wtNedd4-2 + wtSGK2	13,7 ± 2,2 nA	20
+ wtNedd4-2 + wtSGK3	34,9 ± 3,0 nA	25
+ wtNedd4-2 + $^{T308D, S473D}$ PKB	18,6 ± 2,2 nA	22

Tabelle 12: Arithmetischer Mittelwert und Standardfehler der Expression von EAAT1 und Nedd4-2 mit den verschiedenen Kinasen

Mit den oben gezeigten Ergebnissen bleibt unklar, ob die Aufhebung des inhibitorischen Effekts von Nedd4-2 durch ^{S422D}SGK1 wirklich auf eine Interaktion der SGK1 mit Nedd4-2 zurückzuführen ist, oder ob diese Aufhebung

allein durch eine bloße Überlagerung des inhibitorischen Nedd4-2 Effekts und der stimulierenden Wirkung der SGK auf EAAT1 zustande kommt.

Daher wurden Experimente durchgeführt, die eine mögliche direkte Interaktion zwischen Nedd4-2 und SGK untersuchen sollen.

Ersetzt man in der Sequenz des Nedd4-2 Proteins die Aminosäuren Ser382 und Ser468 durch Asparagin, so verhindert man die Phosphorylierung des Nedd4-2 Proteins durch SGK. Diese Phosphorylierung führt nach heutigem Kenntnisstand zu einer Beeinträchtigung der Ubiquitinierungsfähigkeit des Nedd4-2 Proteins [32]. $^{S382A, S468A}$Nedd4-2 ist somit immer noch aktiv, kann aber durch SGK nicht phosphoryliert und damit nicht in seiner Fähigkeit zur Ubiquitinierung beeinträchtigt werden.

In der Tat zeigen die Messdaten, dass ^{S422D}SGK1 nicht in der Lage ist, den Glutamattransport von EAAT1 und $^{S382A, S468A}$Nedd4-2 injizierten Zellen zu steigern. Im Vergleich dazu ist ^{S422D}SGK1 aber durchaus fähig, den inhibitorischen wtNedd4-2 Effekt völlig aufzuheben (rötlich unterlegt ist die Wirkung von ^{S422D}SGK1 auf $^{S382A, S468A}$Nedd4-2 im Vergleich zu wtNedd4-2).

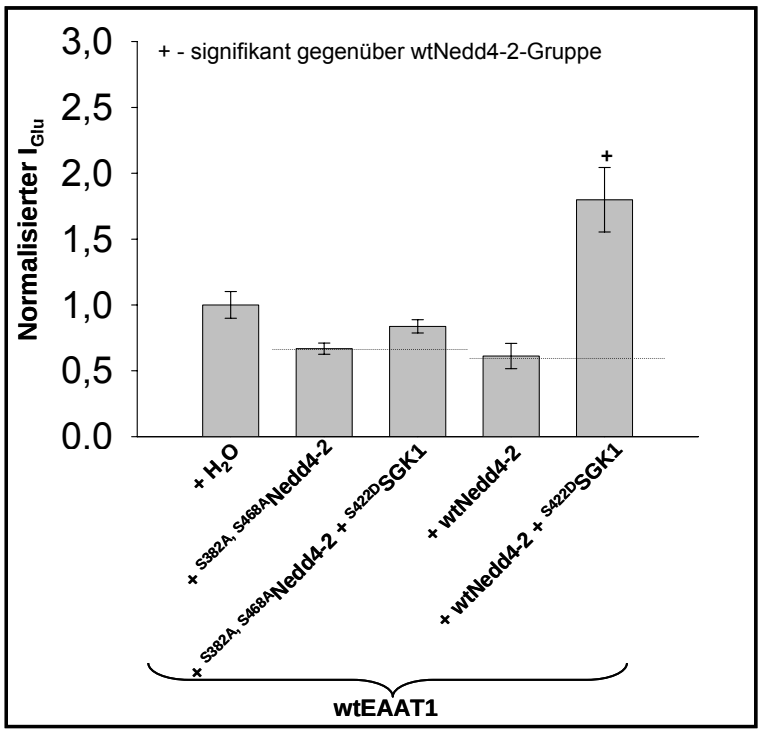

Abbildung 20: Die $^{S382A, S468A}$Nedd4-2 Mutante kann durch ^{S422D}SGK1 nicht oder nur gering gehemmt werden (rötlich unterlegt: die Aufhebung des inhibitorischen Nedd4-2 Effekts)

Expression wtEAAT1	Arithmetisches Mittel ± Standardfehler (normalisiert)	n
+ H_2O	1,0 ± 0,1	18
+ $^{S382A, S468A}$Nedd4-2 + H_2O	0,7 ± 0,0	21
+ $^{S382A, S468A}$Nedd4-2 + ^{S422D}SGK1	0,8 ± 0,1	18
+ wtNedd4-2 + H_2O	0,6 ± 0,1	33
+ wtNedd4-2 + ^{S422D}SGK1	1,8 ± 0,2	29

Tabelle 13: Arithmetischer Mittelwert und Standardfehler (normalisiert)

3.1.3 Kinetische Untersuchung der EAAT1 Regulation

Zur genaueren Betrachtung der EAAT1 Regulation wurden kinetische Analysen durchgeführt. Dafür wurde mit Hilfe der Voltage clamp Technik der Glutamat induzierte Einwärtsstrom bei 6 unterschiedlichen Konzentrationen von Glutamat im Bereich von 1 µM bis 1 mM gemessen. Man erhält damit nähere Aufschlüsse über die kinetischen Eigenschaften des Transporters. Für diese Arbeit war es insbesondere wichtig zu prüfen, ob sich die Affinität des Transporters für Glutamat bei Koexpression von SGK oder Nedd4-2 signifikant verändert.
Die erhaltenen Messdaten zeigen ebenfalls, dass der maximale Glutamatstrom (also V_{max}) durch Nedd4-2 verkleinert und durch ^{S422D}SGK1 vergrößert wird. Dabei zeigt sich aber keine gleichzeitige Veränderung der Glutamat-konzentration, die benötigt wird, um den halbmaximalen Einwärtsstrom (und damit die halbmaximale Transportrate) zu erlangen. Der K_m-Wert des EAAT1 bleibt durch die Koexpression von hSGK und Nedd4-2 also unbeeinflusst.

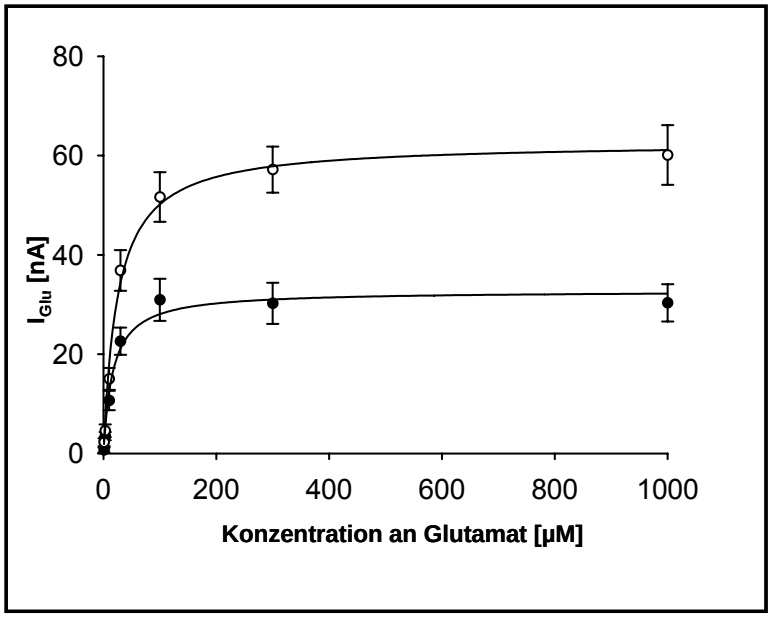

Abbildung 21: Michaelis-Menten Kinetik für EAAT1-injizierte Zellen, die mit H_2O (●) bzw. mit ^{S422D}SGK1 (○) koexprimiert wurden

Expression von wtEAAt1	V_{max}	$K_{0,5}$ (Glu)	n
+ H_2O	33,5 ± 3,9 nA	23,7 ± 4,8 µM	13
+ ^{K127N}SGK1	35,0 ± 3,9 nA	25,1 ± 3,3 µM	9
+ ^{S422D}SGK1	60,8 ± 5,1 nA	26,1 ± 3,7 µM	15
+ Nedd4-2	10,5 ± 1,8 nA	24,7 ± 8,4 µM	14
+ ^{S422D}SGK1 + Nedd4-2	37,2 ± 9,0 nA	23,4 ± 3,6 µM	10

Tabelle 14: Zusammenfassung des maximalen induzierbaren Stroms und der K_m-Werte; obwohl sich V_{max} zum Teil unterscheidet (grün) sind die K_m-Werte nicht signifikant unterschiedlich (gelb)

Die kinetischen Untersuchungen zeigen somit, dass die Koexpression von SGK1 und auch Nedd4-2 die Transportrate des EAAT1 regulieren. Dabei sind aber keine Veränderungen der Affinität des Transporters messbar.

3.2 Regulation des EAAT2

3.2.1 EAAT2 und hSGK

Injektion von EAAT2 cRNA führt zur Expression des EAAT2 Proteins in der Zellmembran der Oozyte. Es ergibt sich dann ein Glutamat induzierter Einwärtsstrom.

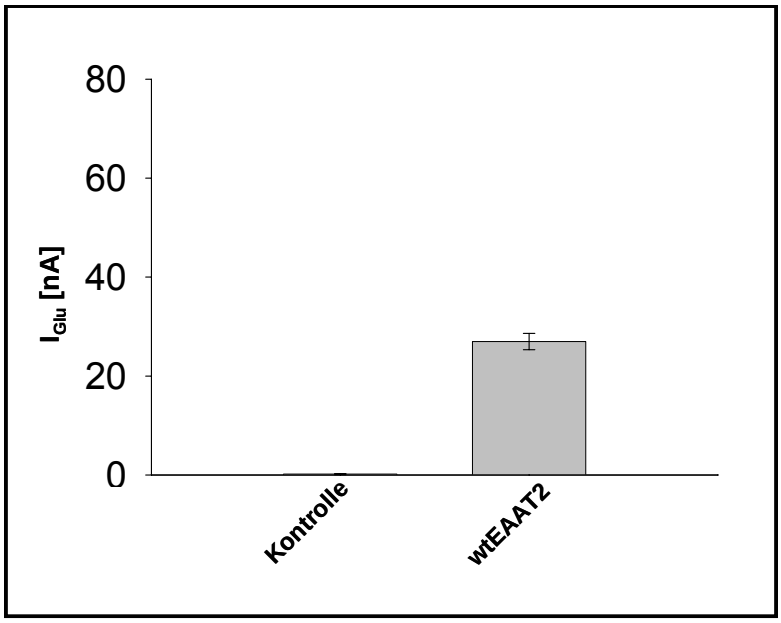

Abbildung 22: Glutamat induzierter Einwärtsstrom bei nicht injizierten und wtEAAT2 injizierten Zellen (1mM Glutamat)

Das EAAT2 Protein besitzt im Gegensatz zum EAAT1 Protein keine SGK Phosphorylierungs-Site, an der es durch SGK direkt phosphoryliert werden kann.

Es konnten jedoch auch schon verschiedene andere Proteine gefunden werden, die trotz fehlender Phosphorylierungs-Site durch die SGK reguliert werden [82]. Koexprimiert man in *Xenopus laevis* Oozyten wtEAAT2 und ^{S422D}SGK1, so kommt es zu einem signifikanten Anstieg des Glutamat induzierten Einwärtsstrom I_{Glu} auf den nahezu doppelten Wert verglichen zu

den wtEAAT2 / DEPC-Wasser injizierten Zellen. Diese stimulierende Eigenschaft der ^{S422D}SGK1 besitzt die inaktive Mutante ^{K127N}SGK1 nicht.

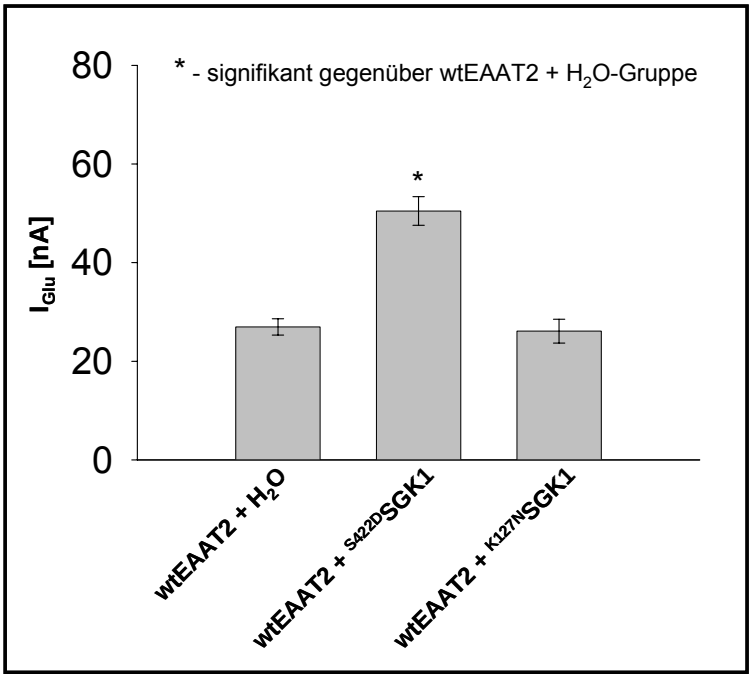

Abbildung 23: Koexpression des EAAT2 mit ^{S422D}SGK1 und ^{K127N}SGK1

Beide anderen Isoformen der hSGK, also sowohl SGK2 als auch SGK3, sind ebenfalls in der Lage bei Koexpression mit wtEAAT2 I_{Glu} signifikant zu erhöhen.

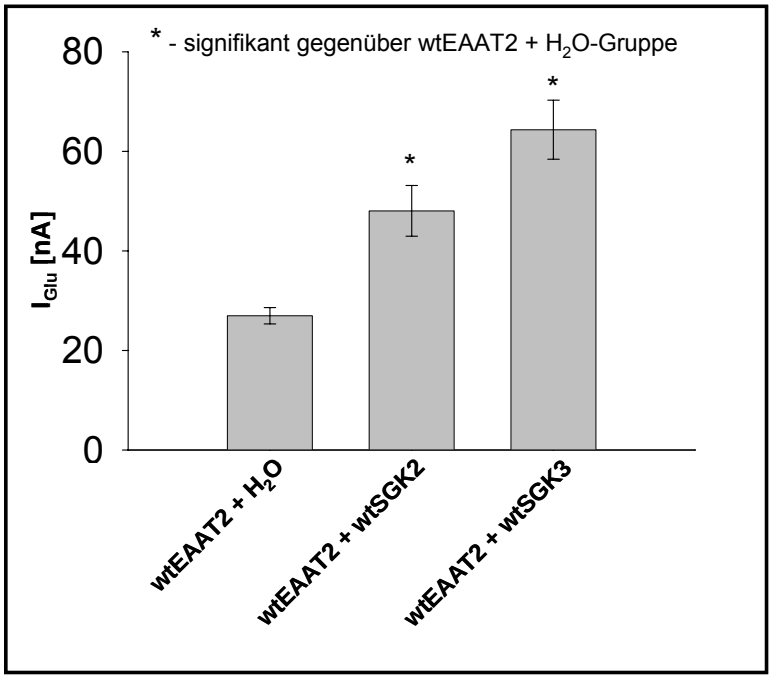

Abbildung 24: EAAT2 Koexpression mit wtSGK2 und wtSGK3

Darüber hinaus kann auch bei Zellen mit Koexpression von wtEAAT2 und $^{T308D,\ S473D}$ PKB ein schwach, aber trotzdem signifikant erhöhter I_{Glu}-Wert gemessen werden. In diesem Punkt unterscheiden sich also EAAT1 und EAAT2, da $^{T308D,\ S473D}$ PKB nur bei EAAT2 einen stimulierenden Effekt hat.

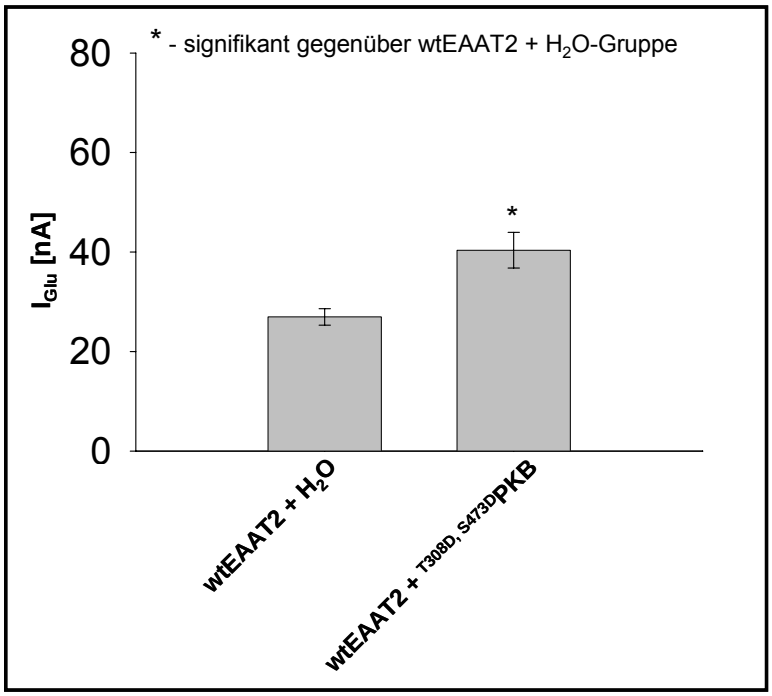

Abbildung 25: EAAT2 Koexpression mit $^{T308D,\ S473D}$PKB

Expression	Arithmetisches Mittel ± Standardfehler	n
wtEAAT2 + H_2O	27,0 ± 1,6 nA	81
wtEAAT2 + ^{S422D}SGK1	50,5 ± 2,9 nA	53
wtEAAT2 + ^{K127N}SGK1	26,1 ± 2,4 nA	32
wtEAAT2 + wtSGK2	48,0 ± 5,1 nA	30
wtEAAT2 + wtSGK3	64,3 ± 5,9 nA	28
wtEAAT2 + $^{T308D, S473D}$PKB	40,4 ± 3,6 nA	26

Tabelle 15: Arithmetischer Mittelwert und Standardfehler bei Expression von EAAT2 mit den verschiedenen Kinasen

3.2.2 Inhibition des EAAT2-Transports durch Nedd4-2

Das EAAT2 Protein besitzt genauso wie das EAAT1 Protein kein PY-Motiv, welches für eine direkte Interaktion mit Nedd4-2 nötig zu sein scheint. Trotzdem wird die Transportrate des EAAT2 durch Koexpression mit wtNedd4-2 signifikant um mehr als 80% inhibiert. Diese Inhibition kann durch eine weitere Koexpression mit ^{S422D}SGK1 fast vollständig wieder ausgeglichen werden, während ^{K127N}SGK1 nicht in der Lage ist, die Nedd4-2 Inhibition wesentlich zu beeinflussen.

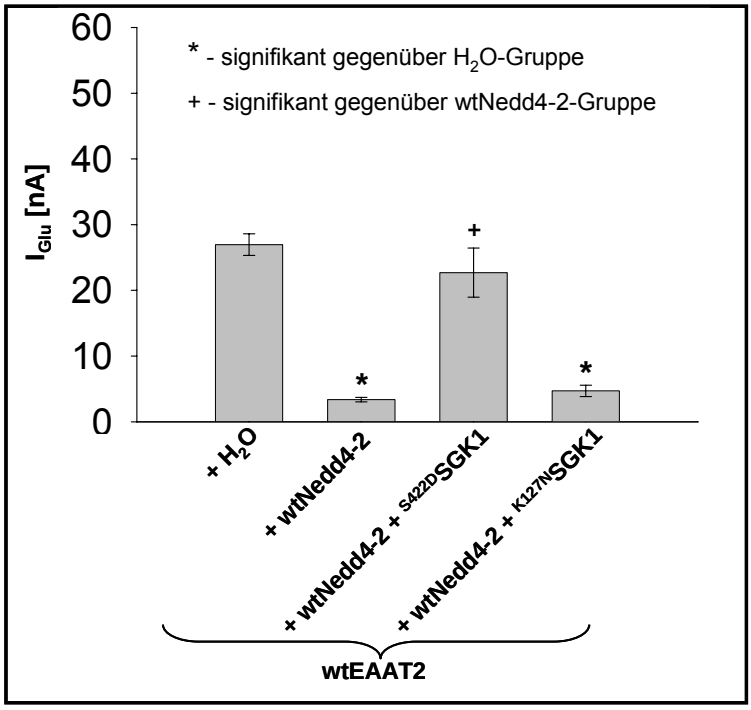

Abbildung 26: Koexpression von EAAT2 und Nedd4-2 mit ^{S422D}SGK1 und ^{K127N}SGK1

Werden wtEAAT2 und wtNedd4-2 koexprimiert mit hSGK3, so wird auch hier die inhibitorische Wirkung des wtNedd4-2 zumindest teilweise aufgehoben. Während hSGK2 und $^{T308D,\ S473D}$PKB bei Koexpression mit Nedd4-2 keinen signifikanten Einfluss auf den Nedd4-2 Effekt haben, hebt hSGK3 den inhibitorischen Effekt des Nedd4-2 völlig auf und ist damit in seiner Wirkung mit ^{S422D}SGK1 vergleichbar (siehe **Tabelle 16**).

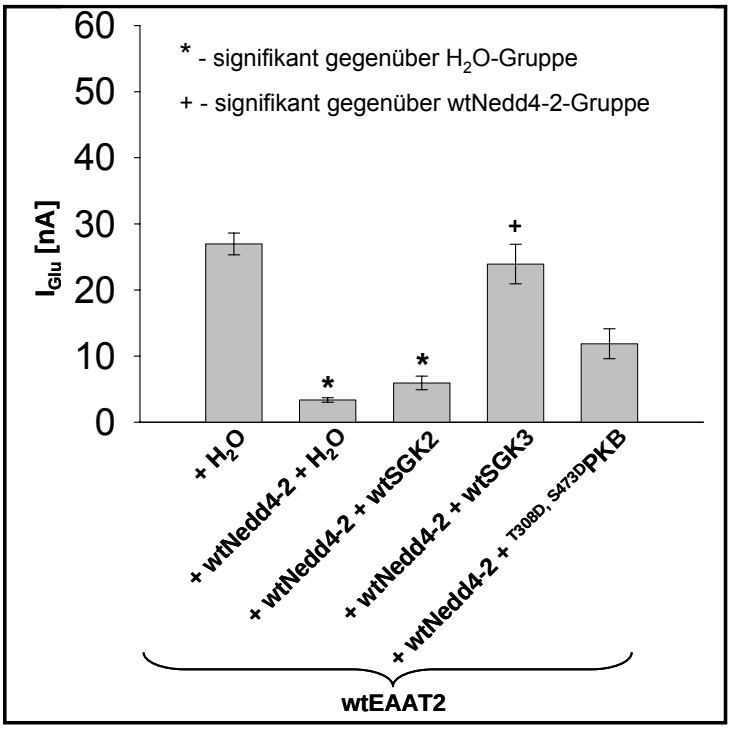

Abbildung 27: Beeinflussung des inhibitorischen Effekts von Nedd4-2 durch die verschiedenen Kinasen

Expression wtEAAT2	Arithmetisches Mittel ± Standardfehler	n
+ H_2O	27,0 ± 1,6 nA	81
+ wtNedd4-2 + H_2O	3,4 ± 0,3 nA	30
+ wtNedd4-2 + ^{S422D}SGK1	22,7 ± 3,7 nA	28
+ wtNedd4-2 + ^{K127N}SGK1	4,7 ± 0,9 nA	20
+ wtNedd4-2 + wtSGK2	5,9 ± 1,0 nA	17
+ wtNedd4-2 + wtSGK3	23,9 ± 3,0 nA	19
+ wtNedd4-2 + $^{T308D, S473D}$ PKB	11,9 ± 2,3 nA	20

Tabelle 16: Arithmetischer Mittelwert und Standardfehler bei Expression von EAAT2 und Nedd4-2 mit verschiedenen Kinasen

3.2.3 EAAT2 und GTRAP48

GTRAP48 wurde 2001 durch Jackson et al. als Protein identifiziert, das in der Regulation von EAAT4 eine wesentliche Rolle spielt [55]. Durch eine Interaktion mit dem C-Terminus des EAAT4-Proteins kommt es zu einer Stabilisierung und Verankerung des EAAT4-Moleküls in der Membran und somit zur vermehrten Expression. Jackson et al. konnte eine strikte Kolokalisation des GTRAP48 mit EAAT4 feststellen, zeigte aber auch, dass extrazerebellare Lokalisationen im Striatum, Hippokampus und im zerebralen Kortex vorkommen.
Das GTRAP48 Protein besitzt eine PDZ-Domäne und gehört damit zu einer Gruppe von Proteinen, die als mögliche interagierende Proteine an der Regulation von Glutamattransportern beteiligt sein können.
Wird GTRAP48 mit wtEAAT2 koexprimiert, so kommt es zum signifikanten Anstieg des I_{Glu}.

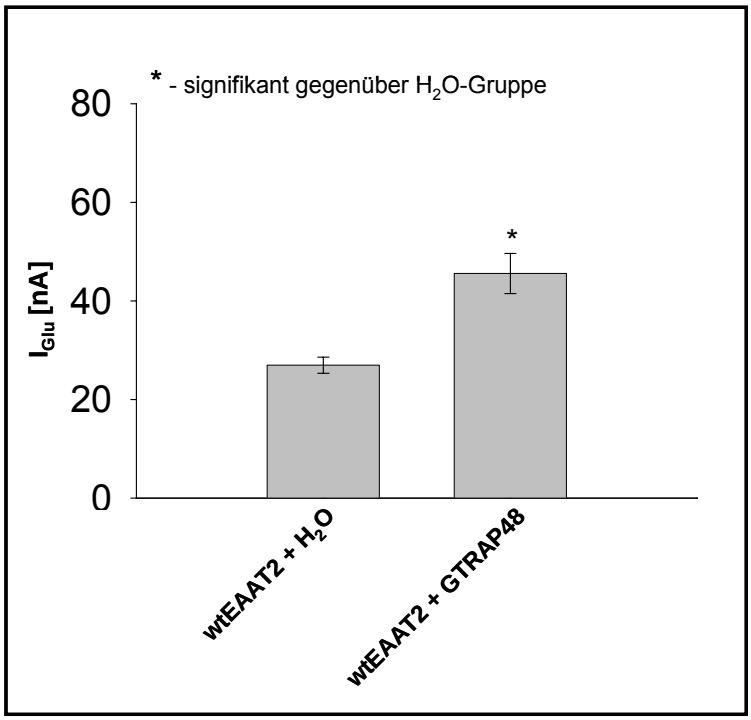

Abbildung 28: GTRAP48 reguliert den EAAT2 Transport

Expression wtEAAT2	Arithmetisches Mittel ± Standardfehler	n
+ H_2O	27,0 ± 1,6 nA	81
+ GTRAP48	45,6 ± 4,1 nA	25

Tabelle 17: Arithmetischer Mittelwert und Standardfehler bei Expression von EAAT2 und GTRRAP48

3.3 Regulation des EAAT3

3.3.1 Immunolokalisierung des EAAT3 und der hSGK

In **Kapitel 1.2.4** wurde die retinale Lokalisation des EAAT3 beschrieben [91]. Auch die hSGK ist retinal exprimiert. Für die weitere Arbeit ist nun von Interesse, ob es eine retinale Kolokalisation von wtEAAT3 und hSGK gibt. Zu diesem Zweck wurden Doppelanfärbungen an Retinae von adulten Ratten durchgeführt.
Zur immunhistochemischen Anfärbung wurde polyklonales Anti-SGK1 Antiserum benutzt [123].

SGK

In **Abbildung 29** ist ein Schichtpräparat der Retina einer adulten Ratte dargestellt. Zur immunhistochemischen Anfärbung wurde ein polyklonales Anti-SGK1 Antiserum benutzt [123]. Es stellt damit die Expression von SGK1 in der Retina dar.
Die immunhistochemische Abbildung zeigt eine starke Anfärbung der meisten Neuronen der Ganglienzellschicht (GCL) (dicke Pfeile). Vor allem Zellen mit einem Durchmesser von mehr als 12 µm sind stärker angefärbt. Die Faserschicht, die durch die Axone der Ganglienzellen gebildet wird, zeigt keine SGK1 Immunoreaktion. Da es allgemein bekannt ist , dass zirka die Hälfte aller Zellen in der Ganglienzellschicht der Nagetiere Amakrinzellen sind, die dort

quasi „fehllokalisiert“ sind, stellen die angefärbten Zellen nicht nur Ganglienzellen, sondern auch Amakrinzellen dar.

Zudem fand man immunoreaktive Zellen für den SGK1 Antikörper in der inneren Körnerschicht (INL). Ein erster Anteil markierter Zellen verläuft entlang der Grenze zwischen INL und innerer plexiformer Schicht (IPL) (in Abbildung mit Doppelpfeil und Dreieck gekennzeichnet). Aufgrund ihrer Lokalisation können diese Zellen als Amakrinzellen identifiziert werden.

Eine Immunoreaktion konnte zudem in drei schmalen, schichtartigen Bändern in der inneren plexiformen Schicht (IPL) gefunden werden. Band 1 verläuft dabei im äußersten Gebiet der IPL, Band 2 in 25% und Band 3 in 50% Tiefe der IPL.

Keine SGK Anfärbung konnte in der äußeren plexiformen Schicht beobachtet werden.

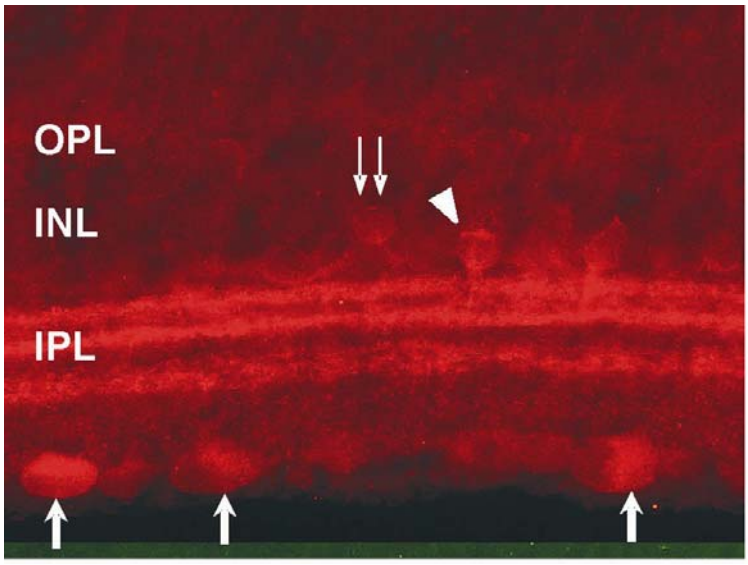

Abbildung 29: Immunhistochemie eines Schichtpräparates der Retina einer adulten Ratte zur Darstellung retinaler **SGK1** Expression.

Dicke Pfeile → Zellen der Ganglienzellschicht (Neuronen**,** Amakrinzellen)

Dreieck, Doppelpfeil → Amakrinzellen in der inneren Körnerschicht

EAAT3

In **Abbildung 30** ist das Bild einer mit EAAT3-Antikörpern angefärbten Rattenretina dargestellt.

Das Anfärben mit EAAT3 spezifischen Antikörpern offenbart die Expression des EAAT3 in augenscheinlich allen Zellen der Ganglienzellschicht (GCL). Die Pfeile zeigen eine bedeutende Immunoreaktion der GCL an, bestehend aus markierten Ganglienzellen und fehllokalisierte Amakrinzellen (siehe oben). Außerdem findet sich eine unvollständige Anfärbung der inneren Körnerschicht (INL) (Dreieck und Doppelpfeil), die ein Maximum an der Grenze zur inneren plexiformen Schicht (IPL) besitzt. Diese Anfärbung der inneren plexiformen Schicht nimmt dann langsam in Richtung Ganglienzellschicht ab. Die angefärbten Zellen der INL können als Amakrinzellen identifiziert werden. Die Anfärbung der INL scheint homogener für EAAT3 als für SGK1 zu sein. Im Gegensatz zur SGK1, zeigt sich auch eine Anfärbung für EAAT3 in der äußeren plexiformen Schicht.

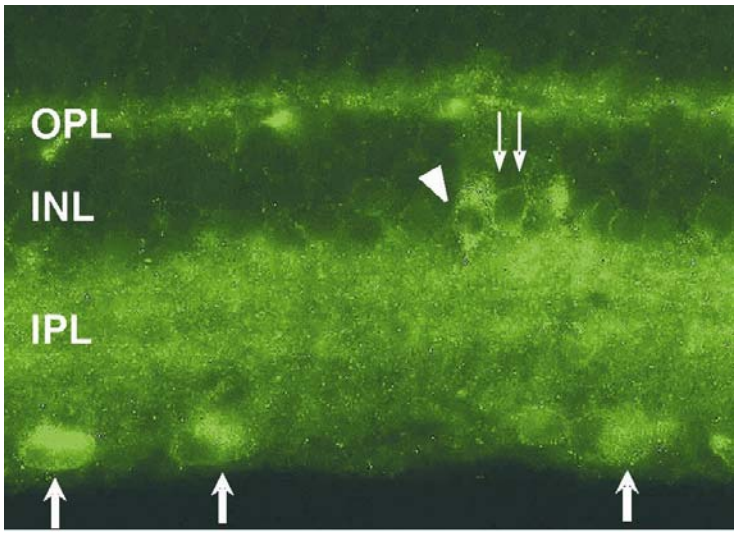

Abbildung 30: Immunhistochemie eines Schichtpräparates der Retina einer adulten Ratte.
Die Abbildung zeigt die retinale **EAAT3** Expression.
Dicke Pfeile → Zellen der Ganglienzellschicht (Neurone, Amakrinzellen)
Dreieck, Doppelpfeil → Amakrinzellen in der inneren Körnerschicht
Es zeigt sich eine deutliche Bande im Bereich der OPL

Doppelanfärbung von EAAT3 und SGK1

Immunoanfärbung mit SGK1- und EAAT3-Antikörper weist auf eine Überlappung von SGK1 und EAAT3 Expression hin und ist in **Abbildung 31** dargestellt.

Amakrinzellen des inneren Teils der inneren Körnerschicht (INL) (Dreieck) und Zellen der Ganglienzellschicht (GCL) (dicke Pfeile) sind deutlich angefärbt und stellen damit Zellen dar, die sowohl EAAT3 als auch SGK1 exprimieren. Neben diesen klar angefärbten Zellen sind in der GCL und in der INL weitere Zellen zu sehen, die zwar eine gewisse Färbung zeigen, aber eine deutliche und klare Immunreaktion vermissen lassen. Trotzdem ist es sehr wahrscheinlich, dass zumindest die Zellen des INL eine Koexpression von EAAT3 und SGK1 besitzen. In der äußeren plexiformen Schicht (OPL) findet sich keine Koexpression.

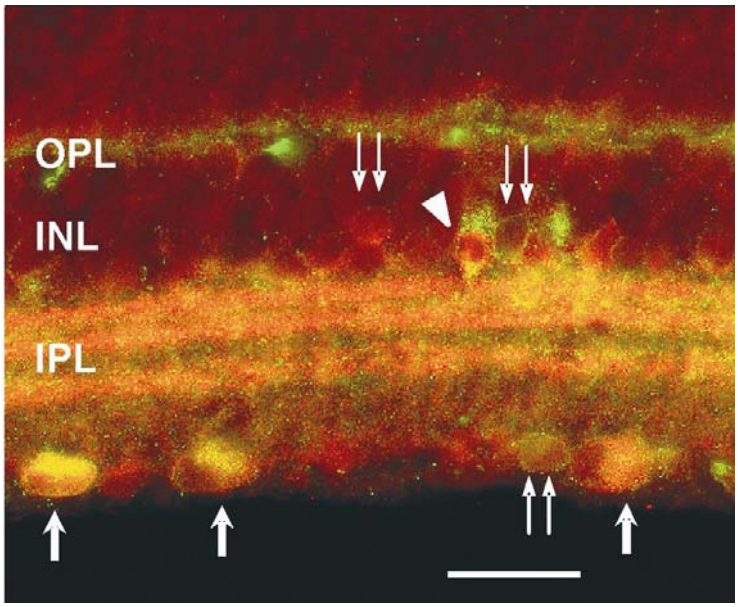

Abbildung 31: Immunhistochemie eines Schichtpräparates der Retina einer adulten Ratte zur Bestimmung der Kolokalisation von **SGK1** und **EAAT3**.

Dicke Pfeile	→ Zellen der Ganglienzellschicht (GCL) (Neurone, Amakrinzellen) mit Kolokalisation von EAAT3 und SGK1
Dreieck	→ Amakrinzellen in der inneren Körnerschicht (INL)
Doppelpfeil	→ Zellen mit unklarer aber wahrscheinlicher Immunoreaktion

3.3.2 Elektrophysiologische Untersuchung von EAAT3 und SGK

Expression von EAAT3 cRNA führt zur Ausbildung eines Glutamat induzierten Einwärtsstrom bei Zugabe von 1mM Glutamat in die Badlösung.

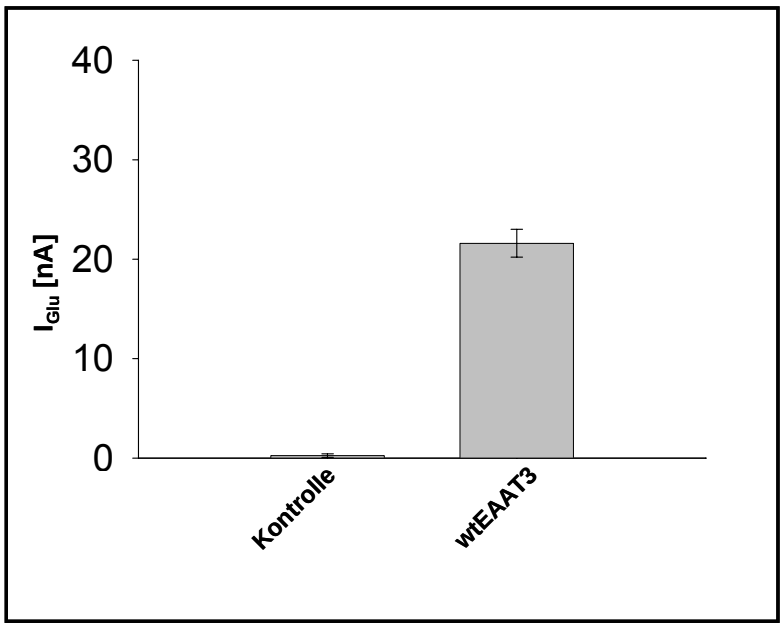

Abbildung 32: Die nicht EAAT3 injizierte Kontrollgruppe zeigt keinen Glutamat induzierten Einwärtsstrom

Bei der Untersuchung des wtEAAT3 wurde auf die Koinjektion von ^{S422D}SGK1 und ^{K127N}SGK1 verzichtet, es wurden nur die wtSGK Isoformen verwendet. Dabei zeigt sich, dass Oozyten, die wtEAAT3 mit hSGK1 oder hSGK3 koexprimieren, einen signifikant erhöhten I_{Glu} bei der Messung aufweisen. Demgegenüber ist hSGK2 nicht in der Lage, den Glutamattransport signifikant zu steigern.

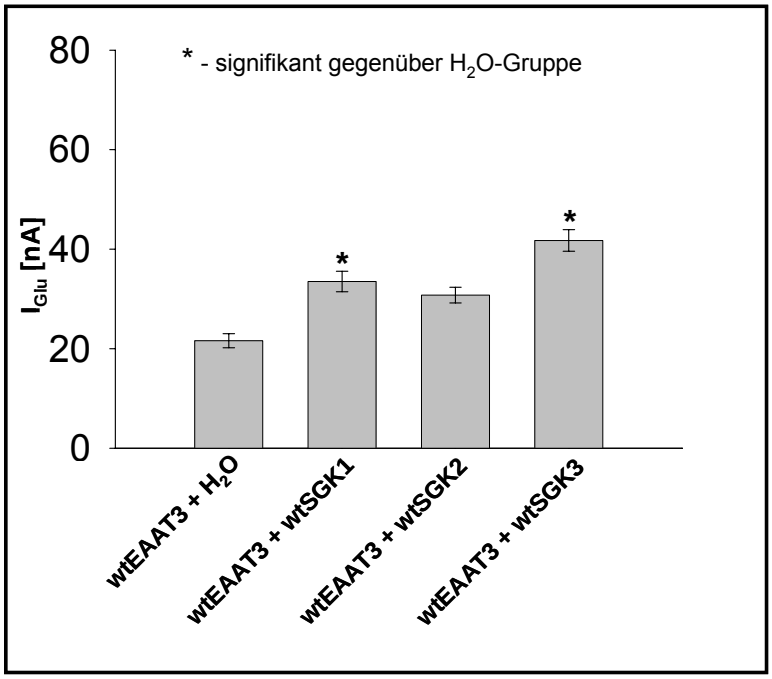

Abbildung 33: EAAT3 Koexpression mit wtSGK1, wtSGK2, wtSGK3

Auch die zur SGK verwandte Serin/Threonin Kinase PKB kann den I_{Glu} des EAAT3 signifikant steigern.

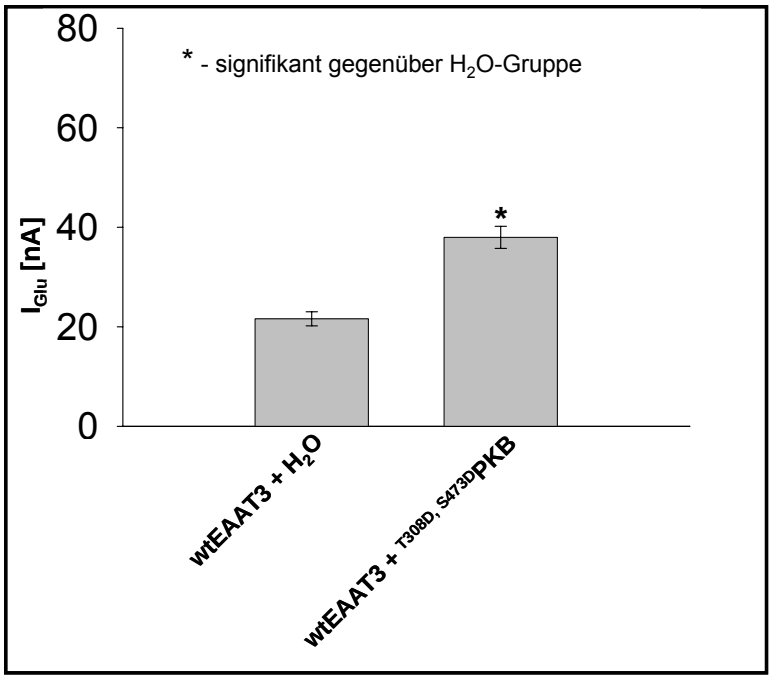

Abbildung 34: EAAT3 Koexpression mit $^{T308D, S473D}$PKB führt zur signifikanten Steigerung des I_{Glu}

Wie in **Tabelle 18** ersichtlich führt die Koexpression von hSGK3 zur höchsten Transportrate des EAAT3.

Expression	Arithmetisches Mittel ± Standardfehler	n
wtEAAT3 + H_2O	21,6 ± 1,4 nA	30
wtEAAT3 + wtSGK1	33,5 ± 2,1 nA	26
wtEAAT3 + wtSGK2	30,8 ± 1,6 nA	20
wtEAAT3 + wtSGK3	41,8 ± 2,2 nA	26
wtEAAT3 + $^{T308D, S473D}$PKB	38,0 ± 2,2 nA	26

Tabelle 18: Arithmetischer Mittelwert und Standardfehler für die Expression von EAAT3 und den verschiedenen Kinasen

3.3.3 Keine Inhibition des EAAT3-Transports durch Nedd4-2

Die Ubiquitinligase wtNedd4-2 ist nicht in der Lage den Glutamattransport des EAAT3 signifikant herunter zu regulieren. Man sieht in **Abbildung 35**, dass die Koexpression von EAAT3 mit Nedd4-2 und den verschiedenen Kinasen zu gesteigerten I_{Glu}-Werten führt. Eine Ausnahme spielt hier die hSGK2. Dort ist kein signifikanter Anstieg des I_{Glu} zu beobachten.

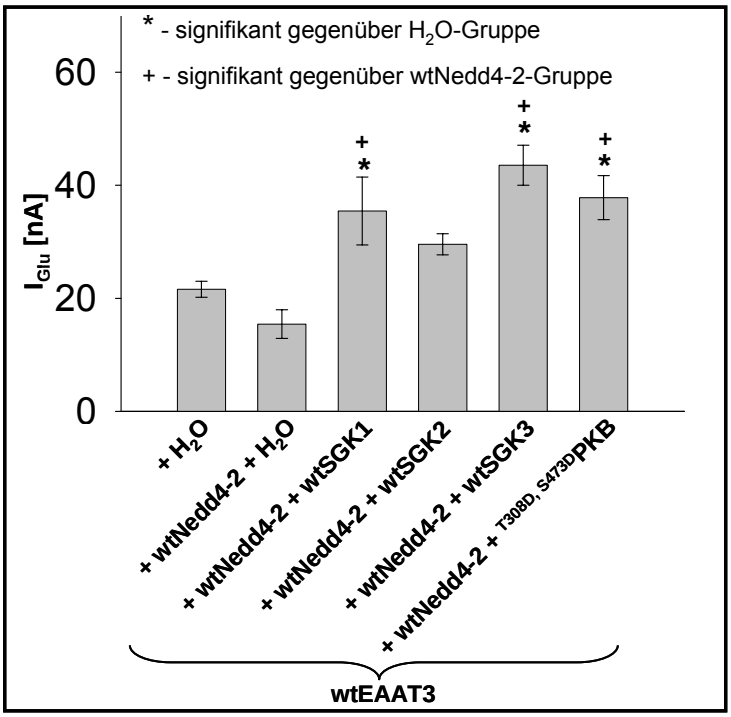

Abbildung 35: Kein inhibitorische Effekt von Nedd4-2 auf EAAT3

Expression wtEAAT3	Arithmetisches Mittel ± Standardfehler	n
+ H_2O	21,6 ± 1,4 µA	30
+ wtNedd4-2 + H_2O	15,4 ± 2,5 µA	21
+ wtNedd4-2 + wtSGK1	35,5 ± 6,0 µA	10
+ wtNedd4-2 + wtSGK2	29,6 ± 1,9 µA	10
+ wtNedd4-2 + wtSGK3	43,6 ± 3,5 µA	10
+ wtNedd4-2 + $^{T308D, S473D}$ PKB	37,8 ± 3,9 µA	10

Tabelle 19: Arithmetischer Mittelwert und Standardfehler bei Expression von EAAT3 mit Nedd4-2 und den verschiedenen Kinasen

Beim Vergleich der **Tabelle 18** und **Tabelle 19** lässt sich festhalten, dass es keine signifikanten Unterschiede gibt, wenn Nedd4-2 zu EAAT3 und der jeweiligen Kinase koinjiziert wird. Auch das ist ein Hinweis auf die Feststellung, dass Nedd4-2 keinen Einfluss auf den EAAT3 Transport besitzt.

3.3.4 EAAT3 und GTRAP48

Das EAAT3 Protein enthält weder SGK Phosphorylierungs-Site noch PY-Motiv, die für direkte Interaktionen mit hSGK bzw. Nedd4-2 nötig zu sein scheinen. Damit ist eine Regulation des EAAT3 durch hSGK und Nedd4-2 über dritte zwischengeschaltete Proteine wahrscheinlich. Ein solches Protein könnte GTRAP48 sein.

Injiziert man die cRNA von GTRAP48 mit wtEAAT3, so steigt der Glutamattransport der Oozyten nicht signifikant an. Koexprimiert man dann dazu noch ^{S422D}SGK1, so kann der I_{Glu}-Wert um 134% gesteigert werden.

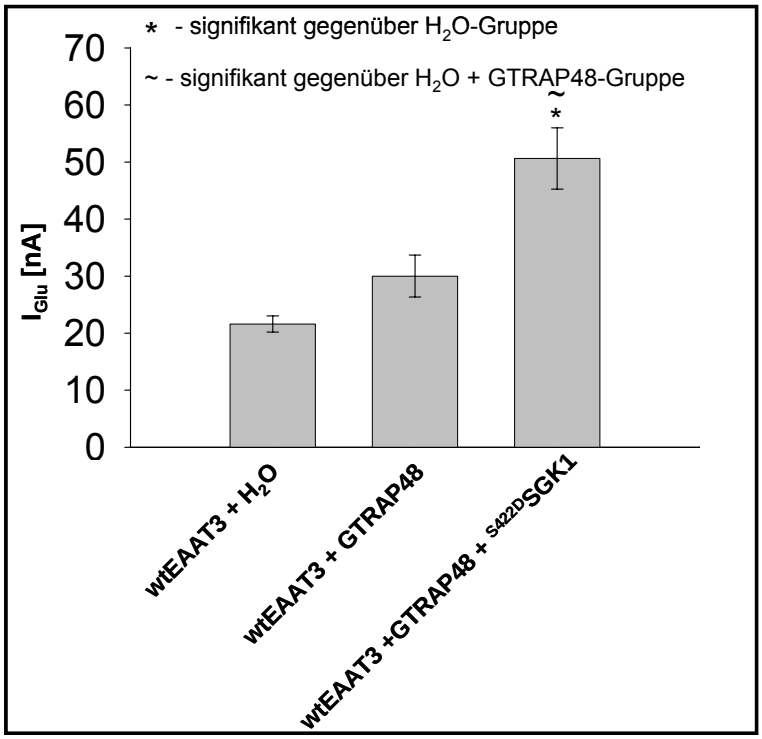

Abbildung 36: GTRAP48 reguliert den EAAT3 Transport

Expression wtEAAT3	Arithmetisches Mittel ± Standardfehler	n
+ H_2O	21,6 ± 1,4 µA	20
+ GTRAP48	30,0 ± 3,7 µA	15
+ GTRAP48 + ^{S422D}SGK1	50,6 ± 5,4 µA	4

Tabelle 20: Arithmetischer Mittelwert und Standardfehler bei Expression von EAAT3 mit GTRAP48 und ^{S422D}SGK1

3.4 Regulation des EAAT5

3.4.1 EAAT5 und hSGK

Die native Oozyte, die nur mit DEPC Wasser injiziert wurde, zeigt keinen Glutamat induzierten Einwärtsstrom. Werden Oozyten jedoch mit 25 ng EAAT5 cRNA injiziert, so entsteht ein Einwärtsstrom von 34,5 ± 2,9 nA bei -60 mV.

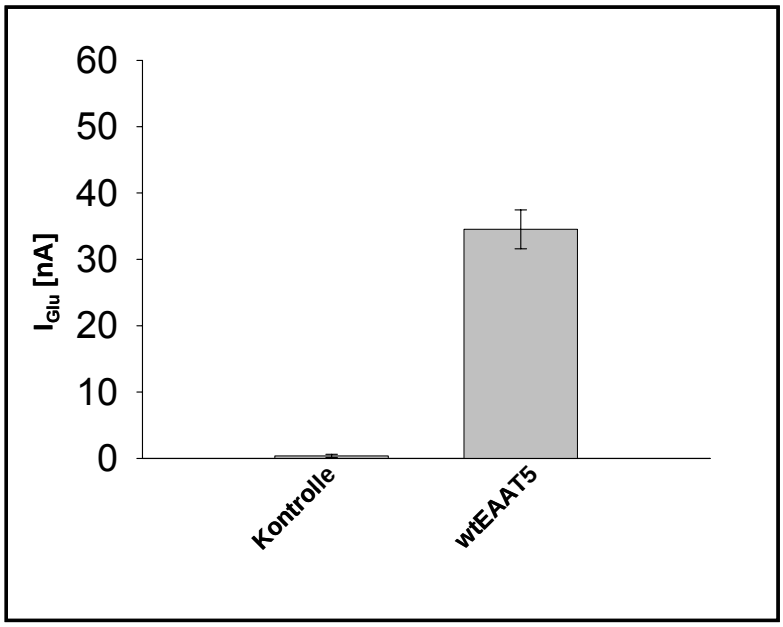

Abbildung 37: Nur die mit EAAT5 cRNA injizierten Zellen zeigen einen Glutamat induzierten Einwärtsstrom

Die Proteinstruktur des EAAT5 besitzt zwei SGK Phosphorylierungs-Sites. Interessanterweise liegen diese beiden aber in einem Abschnitt, der bei allen Transmembranmodellen als extrazellulär angesehen wird (vgl. **Kapitel 1.2.2**). Damit ist eine direkte Phosphorylierung durch SGK an diesen Stellen eher unwahrscheinlich, da SGK als intrazelluläres Protein von der zytoplasmatischen Seite der Membran wirkt.

Trotzdem steigert die Koexpression von ^{S422D}SGK1 den Glutamatstrom signifikant, während die Koexpression der inaktiven Mutante ^{K127N}SGK1 zu keiner signifikanten Änderung des Einwärtsstroms führt.

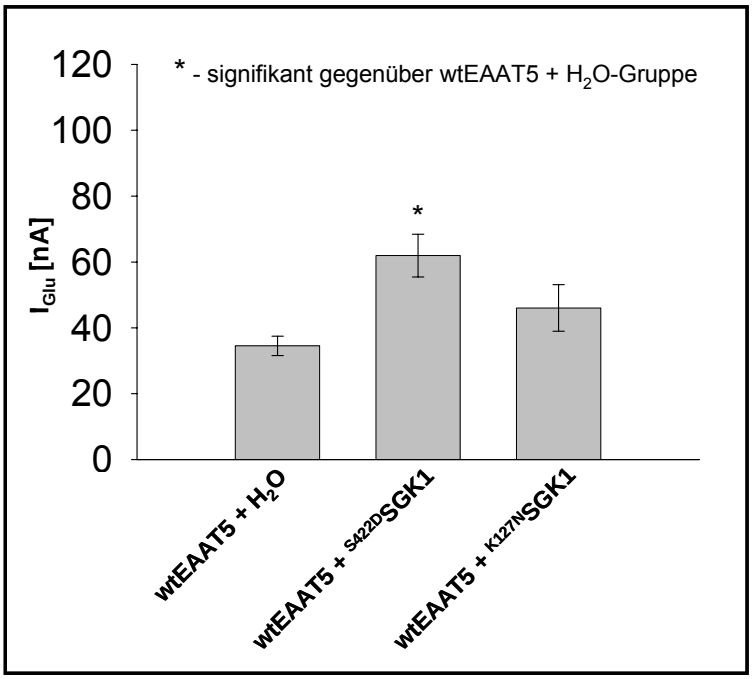

Abbildung 38: Koexpression des EAAT5 mit ^{S422D}SGK1 und ^{K127N}SGK1

Auch die Isoform hSGK3 führt zum signifikanten Anstieg des I_{Glu}. Die hSGK2 stimuliert den EAAT5 Transport nicht.

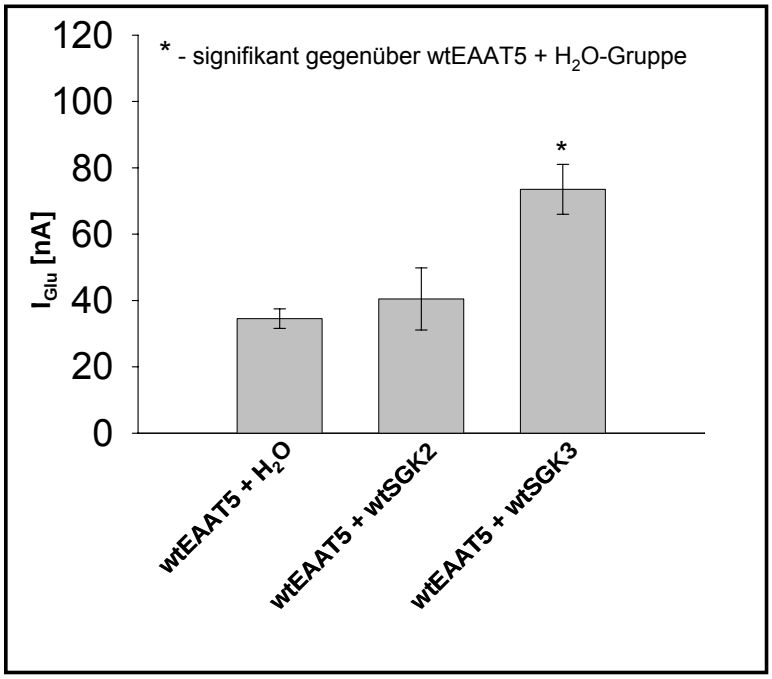

Abbildung 39: EAAT5 Koexpression mit wtSGK2 und wtSGK3

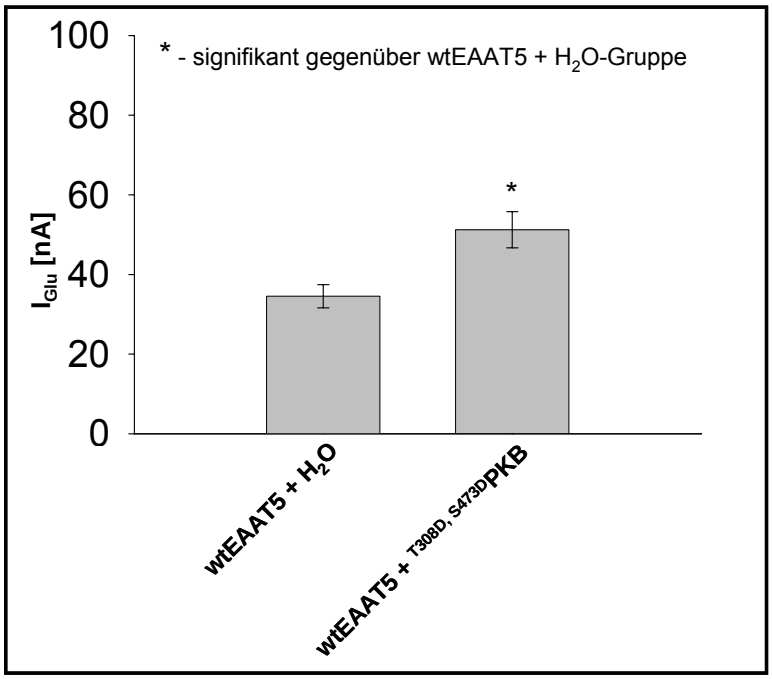

Abbildung 40: EAAT5 Koexpression mit $^{T308D, S473D}$PKB führt zum signifikanten Anstieg des I_{Glu}

Expression	Arithmetisches Mittel ± Standardfehler	n
wtEAAT5 + H_2O	34,5 ± 2,9 nA	46
wtEAAT5 + ^{S422D}SGK1	61,9 ± 6,5 nA	32
wtEAAT5 + ^{K127N}SGK1	46,0 ± 7,1 nA	15
wtEAAT5 + wtSGK2	40,5 ± 9,3 nA	13
wtEAAT5 + wtSGK3	73,5 ± 7,5 nA	18
wtEAAT5 + $^{T308D, S473D}$PKB	51,2 ± 4,5 nA	24

Tabelle 21: Arithmetischer Mittelwert und Standardfehler bei Expression von EAAT5 mit verschiedenen Kinasen

3.4.2 Keine Inhibition des EAAT5-Transports durch Nedd4-2

Das EAAT5 Protein besitzt ein PY-Motiv. Nedd4-2 sollte damit in der Lage sein, das EAAT5 Protein direkt zu ubiquitinylieren und somit zum intrazellulären Abbau zu markieren. Tatsächlich aber besitzt Nedd4-2 auf den EAAT5 Transport keine Wirkung. Der Effekt des Nedd4-2 ist nicht signifikant.

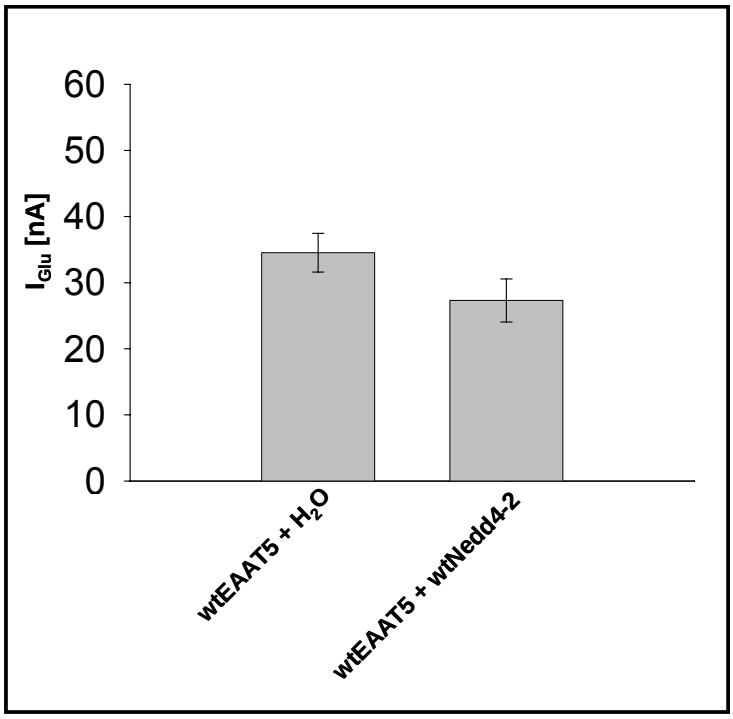

Abbildung 41: Nedd4-2 hat keinen signifikanten Effekt auf den EAAT3 Transport

Expression wtEAAT5	Arithmetisches Mittel ± Standardfehler	n
+ H_2O	34,5 ± 2,9 nA	46
+ wtNedd4-2 + H_2O	27,3 ± 3,3 nA	34

Tabelle 22: Arithmetischer Mittelwert und Standardfehler bei Koexpression von EAAT5 und Nedd4-2

3.4.3 EAAT5 und GTRAP48 und NHERF2

Sowohl GTRAP48 als auch NHERF2 sind Proteine, die eine PDZ-Domäne enthalten. Das gleiche gilt auch für EAAT5, der als einziger Transporter der EAAT-Familie eine PDZ-Domäne enthält. Da die SGK Phosphorylierungs-Site des EAAT5 extrazellulär lokalisiert ist, sind intermittierende Proteine, die einen regulierenden Einfluss auf EAAT5 besitzen und gleichzeitig durch SGK beeinflusst werden, eine mögliche Erklärung für die Regulation des EAAT5 durch SGK. Zwei mögliche Proteine davon sind GTRAP48 und NHERF2.
Für GTRAP48 konnte ja schon gezeigt werden, dass es den EAAT2- und den EAAT3- Transport erhöht (siehe **Kapitel 3.2.3** und **Kapitel 3.3.4**). Der EAAT5 Transport, jedoch, wird durch GTRAP48 nicht erhöht. Auch NHERF2 hat keinen signifikanten Einfluss auf den EAAT5 Transport.

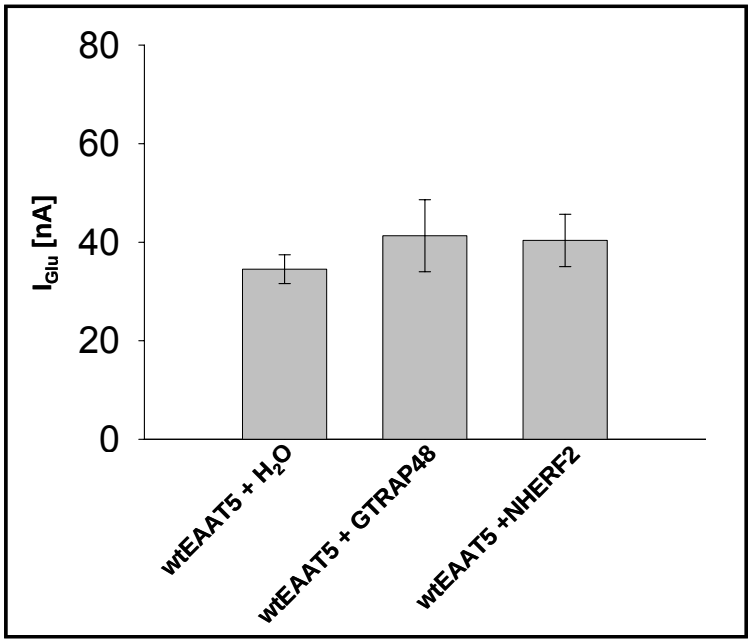

Abbildung 42: GTRAP48 und NHERF2 sind ohne Einfluss auf den EAAT5 Transport

Das SGK Protein besitzt eine PDZ-Domäne und kann hiermit auf Zielproteine über andere PDZ-Domäne enthaltenden Proteine wirken. Eine Interaktion von SGK und NHERF2 wurde anhand des Kaliumkanals ROMK1 gezeigt [83]. Bei Voltage clamp Messungen zeigte sich aber, dass die Koexpression von ^{S422D}SGK1 und NHERF2 den I_{Glu}-Wert des EAAT5 Transports nicht signifikant verändert.

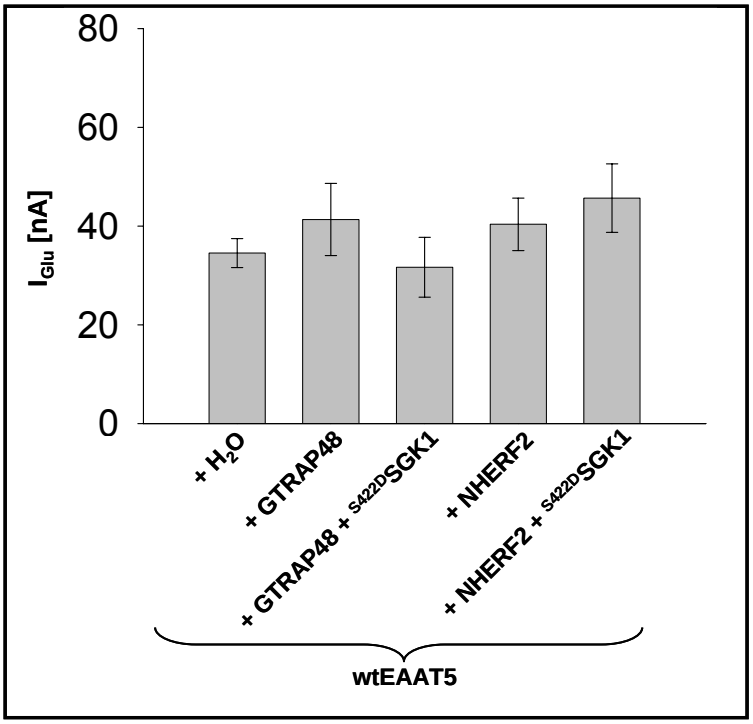

Abbildung 43: Koexpression von ^{S422D}SGK1 mit GTRAP48 oder NHERF2 führt zu keiner signifikanten Veränderung des EATT5 Transports

Expression wtEAAT5	Arithmetisches Mittel ± Standardfehler	n
+ H_2O	34,5 ± 2,9 nA	46
+ GTRAP48	41,3 ± 7,3 nA	19
+ NHERF2	40,3 ± 5,3 nA	9
+ GTRAP48 + ^{S422D}SGK1	31,7 ± 6,1 nA	9
+ NHERF2 + ^{S422D}SGK1	45,7 ± 6,9 nA	9

Tabelle 23: Arithmetischer Mittelwert und Standardfehler bei Koexpression von EAAT5 und GTRAP48 und NHERF2

4. Diskussion und Interpretation

4.1 Fehlerdiskussion

4.1.1 Oozyten als Expressionssystem

Wie in der Einleitung schon dargelegt, werden zahlreiche elektrophysiologische Studien von Transportern und Ionenkanälen in *Xenopus laevis* Oozyten durchgeführt. Generelle Fehlerquellen liegen dabei jedoch in der Ergebnisinterpretation, wenn endogene *Xenopus* Proteine vorhanden sind, die entweder selbst Transporter oder Ionenkanäle sind, oder wenn sie als Regulatoren die heterolog exprimierten Proteine beeinflussen.
Im allgemeinen ist die Expression endogener Proteine in *Xenopus laevis* Oozyten im Vergleich der heterolog exprimierten Proteine verschwindend gering [29]. Deshalb sind die Messergebnisse fast nur abhängig von der Expression heterolog injizierter Proteine. Trotzdem schließt diese Tatsache nicht aus, dass möglicherweise posttranslationelle Modifikationsschritte in *Xenopus* Oozyten verschieden sind zu denen in mammalischen Zellen [112]. Die intrazellulären Signalwege in *Xenopus* Oozyten unterscheiden sich von denen in mammalischen Zellen. Daher können Aussagen, die durch Messungen an Oozyten entstanden sind, nicht mit letzter Sicherheit auf mammalische Zellen übertragen werden.
Für die Interpretation der Ergebnisse ist es weiterhin notwendig zu wissen, dass die Oozyten eine Bipolarität besitzen. In der vegetativen Hemisphäre befindet sich ein Großteil der RNA. Außerdem ist die laterale Membranmobilität in diesem Bereich der Oozyte wesentlich größer [29].
Auch die Verteilung von membranständigen Transportern, Kanälen und Rezeptoren ist in beiden Hemisphären unterschiedlich [9].
Unklar ist bis heute auch, welchen Einfluss die Injektionsstelle auf die Expressionsrate der injizierten RNA hat [9, 112]. Auch eine räumliche Mehr-

oder Minderexpression der Proteine kann nicht ausgeschlossen werden. Da aber bei der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp Methode nicht ein einzelnes Areal der Zellmembran gemessen wird, sondern immer die Ströme über die gesamte Membran [9, 29], kann dieses Problem vernachlässigt werden und der Injektionsort wurde rein zufällig gewählt.

Vorteilhaft wirkt sich der leichte technische Umgang und die gute Reproduzierbarkeit der Oozytenexpressionsexperimente aus. Die zu exprimierenden Proteine sind in so hoher Konzentration vorhanden, dass endogene Transportphänomene in den Hintergrund treten, und somit eine klare Trennung zwischen endo- und exogenem Transport besteht.
Alles in allem ist das *Xenopus laevis* Oozytenexpressionssystem ein etabliertes Verfahren zur Untersuchung von Transportvorgängen. Es ist für die Expression der EAAT und derer elektrophysiologischen Untersuchung nahezu ideal geeignet.

4.1.2 Oozyten und cRNA

Die Oozyten wiesen hinsichtlich ihrer Qualität große Unterschiede auf. Wie in Kapitel 2.2.1 dargelegt, wurde ständig während der Oozytenpräparation, während der cRNA-Injektion und während der Expressionszeit der Proteine der Vitalitätszustand und die Reife der Oozyten beobachtet und gegebenenfalls geschädigte Zellen entfernt. Es hat sich gezeigt, dass zirka 20% der cRNA-injizierten Oozyten im Laufe der 4-6 Tage Expressionszeit durch latente Membranschäden so geschädigt wurden, dass sie nicht zur Messung verwendet werden konnten. Die Größe des Einstechpotentials und des basalen Leckstroms lag dann nicht im tolerierbaren Bereich.
Natürlich war die Qualität der Oozyten abhängig vom Präparationsvorgang. Die Verdauung der Kollagenase führte häufig zu Alterationen der Zellmembran. Die Raumtemperatur und die Qualität der Aufbewahrungslösung beeinflusste

maßgeblich die Qualität der Oozyten. Zudem war natürlich auch die Qualität des Frosches ein entscheidender Punkt für den späteren Zustand der Oozyten. Schwankungen der Oozytenqualität wurden durch eine konsequente Beobachtung der Oozyten und durch striktes Aussortieren der beschädigten Oozyten verhindert. Es wurden demnach nur die Zellen mit einwandfreiem äußeren Erscheinungsbild und einem Haltestrom I_{hold} von -20 bis -100 nA benutzt. Zellen mit schlechtem Ruhemembranpotential und hohem basalen Leckstrom wurden nicht gemessen. Außerdem wurden Messungen einer Serie aus verschiedenen Präparationen und damit von verschiedenen Fröschen durchgeführt, um Fehlerquellen durch eine schlechte Froschqualität zu vermeiden.

Die cRNA-Injektion stellte eine weitere potentielle Fehlerquelle dar. Die cRNA unterlag synthesebedingt geringen Schwankungen. Sie wurde als Stammlösung bei -70°C aufbewahrt, bei Bedarf aufgetaut und zur richtigen Konzentration verdünnt. Bei diesem Vorgang wurde im Mikroliterbereich pipettiert, was zu geringfügigen Pipettierschwankungen führen konnte. Darüberhinaus wies der Injektionsvorgang selbst am Injektomat geringe Schwankungen der Injektionsmenge auf. Auf eine optimale Bedienung und damit eine Minimierung dieser Fehler wurde jedoch stets geachtet. Trotz dieser Maßnahmen kam es jedoch zu Schwankungen im Expressionsniveau der EAAT, die sich in zum Teil unterschiedlich großen I_{Glu}-Werten bei gleicher Glutamatkonzentration der wtEAAT + DEPC Wasser injizierten Zellen zeigten. Diese Schwankungen waren aber so gering, dass keine statistische oder andere Maßnahme als Ausgleichsverfahren eingesetzt werden musste.

4.1.3 Lösungen

Lösungen wurden meist als Stammlösungen angesetzt und bei Gebrauch auf die nötige Konzentration verdünnt. Beim Ansetzen der Stammlösungen und beim Verdünnungsvorgang wurde auf Genauigkeit geachtet. Der pH-Wert und die Gesamtosmolarität wurden stets überprüft. Zudem konnten durch optische Kontrollen Lösungen, die trüb oder verunreinigt waren, erkannt und erneuert werden.
Nicht auszuschließen waren aber Verunreinigungen der Testsubstanzen durch den Herstellungsprozess, die sich der optischen Entdeckung entzogen.
Die Stammlösungen konnten sich zudem teilweise durch den Einfluss von Licht und Temperatur verändern. Daher wurden regelmäßig diese Stammlösungen frisch angesetzt und lichtgeschützt bei gleichbleibender Temperatur im Kühl- bzw. Gefrierschrank aufbewahrt.

4.1.4 Geräte

Während der Messung sollten mechanische Schwingungen oder Erschütterungen weitgehenst vermieden werden, was durch einen schwingungsarmen Tisch größtenteils erreicht werden konnte. Darüberhinaus war auf eine saubere Schwerkraftsuperfusionsanlage zu achten, damit keine Kontamination mit Keimen oder Pilzen am Messplatz zustande kommen konnte. Außerdem musste die Perfusion der Messkammer eine kontinuierlich gleich-bleibende Durchflussrate besitzen, da plötzliche Beschleunigungen des Substratflusses durch Strömungserscheinungen zu kleinsten Bewegungen der Oozyte und damit zu größeren Beschädigungen der Membran durch die eingestochenen Glaselektroden führen würde. Deshalb wurde die Superfusionsanlage vor und nach jedem Gebrauch über längere Zeit mit destilliertem Wasser und 70%igem Ethanol gespült und auf eine ausreichende und kontinuierliche Durchflussrate geachtet.

Die Messelektroden wurden vor Gebrauch neu chloriert und in die Glaskapillaren eingebracht. Durch Verstopfen oder Abbrechen der Glaskapillare kommt es zur Verfälschung der Messwerte. Deshalb wurden die Kapillaren vor dem Einstechen in die Zelle optisch inspiziert und zudem der Elektrodenwiderstand überprüft. Elektroden mit Werten über 2MΩ und unter 0,2 MΩ wurden ausgetauscht.

4.2 Regulation des EAAT1

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einen neuen Mechanismus der EAAT1 Regulation. Die dargestellte Inhibition des Glutamat induzierten Stroms in Zellen, die wtEAAT1 und wtNedd4-2 koexprimieren, verdeutlicht, dass der EAAT1 ein Zielprotein der Ubiquitinligase Nedd4-2 ist. Nedd4-2 ubiquitiniert Proteine und bereitet damit die Internalisierung und den intrazellulären Abbau des Proteins vor. Da das EAAT1 Protein kein PY-Motiv besitzt, eine Aminosäuresequenz, an der Nedd4-2 bevorzugt bindet, ist eine direkte Ubiquitinierung nicht sicher. Möglich ist auch die Ubiquitinierung eines zwischenagierenden Proteins, das seinerseits wiederum den EAAT1 Transport steigert.

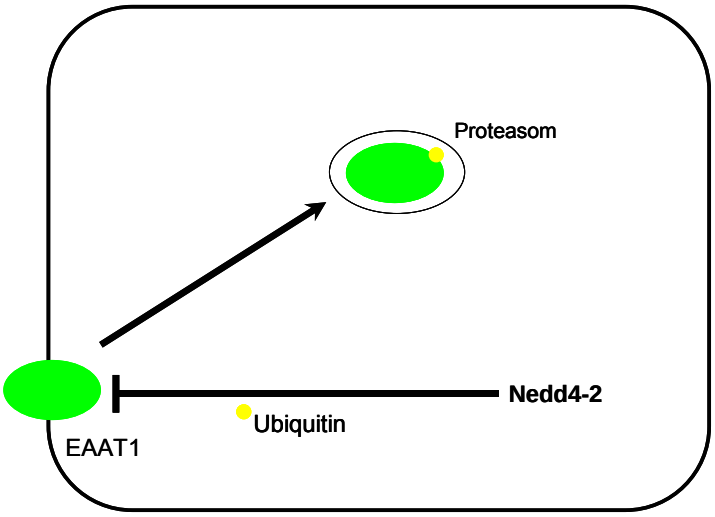

Abbildung 44: Mögliches Modell der Nedd4-2 Inhibition von EAAT1. Nedd4-2 inhibiert EAAT1 durch eine direkte Ubiquitinierung

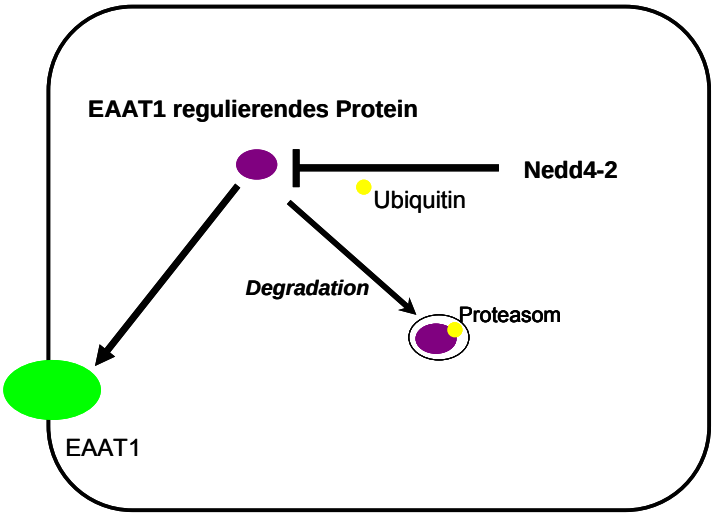

Abbildung 45: weiteres mögliches Modell der Nedd4-2-Inhibition von EAAT1.
Nedd4-2 inhibiert EAAT1 durch eine Ubiquitinierung eines zwischenagierenden Proteins, das seinerseits stimulierend auf EAAT1 wirkt.

Zudem wird offensichtlich, dass Nedd4-2 unter der Kontrolle von SGK1 und SGK3 steht. ^{S422D}SGK1 und SGK3 können den inhibitorischen Effekt von

Nedd4-2 beeinflussen. Dies entspricht Untersuchungen, die zeigten, dass Nedd4-2 durch hSGK phosphoryliert wird, ein Vorgang, der die Fähigkeit zur Ubiquitinierung beeinträchtigt [32]. Diese Tatsache wird durch die Messungen an der $^{S382A,\ S468A}$Nedd4-2 Mutante gestützt. Denn hiermit konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Nedd4-2 zur Aufhebung oder zumindest zur Verkleinerung des Nedd4-2 Effekts führt. Wird $^{S382A,\ S468A}$Nedd4-2, bei der eine Phosphorylierung durch SGK nicht mehr möglich ist, in Zellen exprimiert, so kann ^{S422D}SGK1 den Glutamattransport kaum mehr beeinflussen.
Die inaktive ^{K127N}SGK1 Mutante ist erwartungsgemäß nicht in der Lage, die Nedd4-2 Aktivität zu verändern.
Nur SGK3 ist dabei aber in der Lage, den inhibitorischen Effekt von Nedd4-2 vollständig aufzuheben. ^{S422D}SGK1 dagegen verkleinert diese Inhibition nur. Das lässt darauf schließen, dass ^{S422D}SGK1 nicht in der Lage ist, Nedd4-2 vollständig zu inaktivieren, sondern nur die Interaktion von Nedd4-2 und EAAT1 stört bzw. die Fähigkeit zur Ubiquitinierung vermindert.

^{S422D}SGK1 und SGK3 stimulieren den EAAT1 Transport. Diese Stimulation kann zum Teil durch Inhibition des endogen vorkommenden Nedd4-2 erklärt werden. Nedd4-2 ist nämlich in geringerem Maße auch ohne heterologe cRNA-Injektion in Oozyten exprimiert [32].
Zudem verdeutlichen die Ergebnisse aber auch, dass SGK1 und SGK3 den EAAT1 Transport durch direkte Phosphorylierung stimulieren. Eine negative Ladung in der SGK1 Phosphorylierungs-Site führt zu einer starken Stimulation des Transporters, wohingegen das Ersetzen dieser Site mit Alanin zu einem deutlich herabgesetzten Transport führt (**Kapitel 3.1.1**).
Die SGK Stimulation des EAAT1 wird also einerseits durch Inhibition des Nedd4-2 Proteins und andererseits durch eine direkte Phosphorylierung am Transporter erreicht.

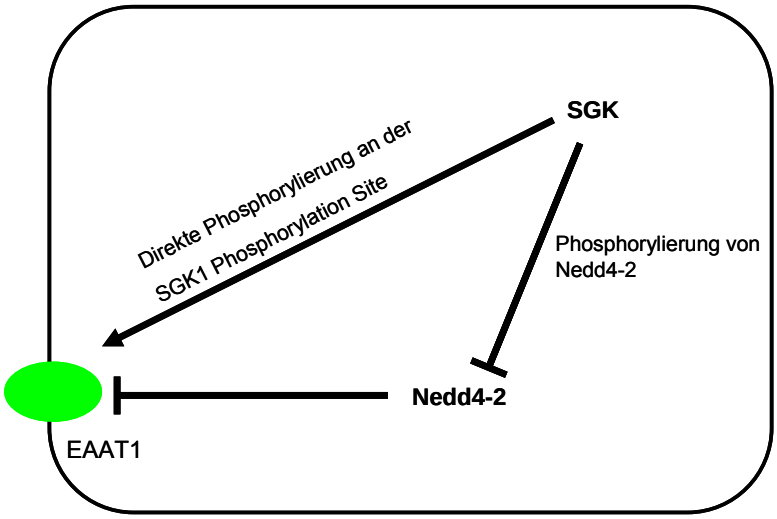

Abbildung 46: Schematisches Modell der SGK Interaktion mit EAAT1

Die Wildtyp SGK1 und SGK3 sind nicht ständig aktiv, sie bedürfen vielmehr eine Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3-Kinase) abhängigen Aktivierung. In diesem Vorgang sind die Phosphatinositid abhängigen Kinasen (PDK) involviert [63]. Es ist generell zu beobachten, dass dieser Aktivierungsweg sich in *Xenopus laevis* Oozyten nicht limitierend auf die Ergebnisse auswirkt, da wtSGK3 einen annähernd gleich großen Effekt auf den EAAT1 Transport besitzt wie die immer aktive ^{S422D}SGK1, bei der die PI-3-Kinase abhängige Aktivierung molekularbiologisch schon simuliert ist.
PKB ist nicht fähig, den Effekt von Nedd4-2 zumindest teilweise zu vermindern. Darüber hinaus führt eine Koexpression von EAAT1 und PKB zu keiner signifikanten Stimulation des Transports, was darauf hinweist, das PKB weder den Nedd4-2 Effekt beeinflusst noch direkt den Transporter zu regulieren vermag.

Die kinetischen Untersuchungen der SGK Regulation ergaben keine Änderungen der Substrataffinität des EAAT1 bedingt durch SGK oder Nedd4-2. Das bedeutet, dass die Regulation des EAAT1 durch SGK oder Nedd4-2 nicht durch die Veränderung kinetischer Eigenschaften zustande kommt. Eher wahrscheinlich ist, dass die Anzahl der EAAT1 Proteine in der Zellmembran durch SGK gesteigert und durch Nedd4-2 vermindert wird.

Im physiologischen Blickpunkt kann der hier gezeigte Regulationsmodus der SGK/PKB und des Nedd4-2 eine Erklärung für die Wirkung verschiedener Wachstumsfaktoren liefern.
IGF (insulin-like growth factor), FGF (fibroblast growth factor) und EGF (epidermal growth factor) wirken stimulierend auf den Glutamattransport. Diese Wachstumsfaktoren konnten nämlich unter anderem als Faktoren identifiziert werden, die die Glutamat Aufnahme in Zellen vergrößern, indem V_{max} vergrößert wird [42, 114]. Eine Vergrößerung des V_{max} würde man dann erwarten, wenn die Anzahl der Transportermoleküle in der Membran zunimmt und die Degradation und damit Internalisation dieser Proteine verzögert wird. Genau diese Vorgänge werden durch SGK und Nedd4-2 erreicht. IGF wirkt stimulierend auf den PI3-Kinase Signalweg, in dessen Verlauf es zu einer Aktivierung der SGK kommt. Das bedeutet, dass zumindest teilweise IGF durch die Aktivierung der SGK den Glutamattransport über EAAT1 stimulieren kann.

Die EAAT1 Regulation ist möglicherweise noch an der Regulation der neuronalen Funktion durch Glukokortikoide beteiligt. Glukokortikoide, aber auch zahlreiche andere Hormone und Zytokine oder oxidativer Stress steigern die SGK Expression [63, 66, 134]. Ob nun diese SGK Aktivatoren auch den Glutamat Transport verändern, ist noch nicht untersucht worden.

Es wurde außerdem berichtet, dass neuronale Schädigung die SGK1 Transkription hochreguliert [53]. Eine verstärkte SGK Transkription verstärkt daraufhin den EAAT1 Glutamattransport. Diese Stimulation des EAAT1 durch SGK kann als protektiver Faktor gegen den Untergang neuronaler Zellen bei neuronaler Schädigung angesehen werden. Denn durch eine stärkere Clearance von Glutamat durch EAAT1 aus dem synaptischen Spalt wird die Neurotoxizität in dieser Situation reduziert.
Aber auch verschiedene Erkrankungen sind in den letzten Jahren in Zusammenhang mit EAAT1 gebracht worden (siehe **Kapitel 1.2.6**), darunter befinden sich so schwere Erkrankungen wie Epilepsie [35, 54, 117, 118], hepatische Enzephalopathie [17] und neurodegenerative Erkrankungen [100].

Diese Erkrankungen sind unter anderem auf die fehlregulierte EAAT1 Funktion zurückzuführen und es wird interessant sein, in Zukunft, zu untersuchen, ob eine gestörte Regulation des EAAT1 durch SGK oder Nedd4-2 zur Pathophysiologie dieser Erkrankungen beiträgt.

4.3 Regulation des EAAT2

Die Zusammenfassung der Messdaten im Ergebnisteil zeigt einen bisher nicht bekannten Regulationsmechanismus des EAAT2. Die Ubiquitinligase Nedd4-2 scheint ein wichtiger Regulator des EAAT2 Transports zu sein, obwohl das EAAT2 Protein kein PY-Motiv als Erkennungssequenz für Nedd4-2 besitzt. Unklar bleibt deshalb dabei, ob Nedd4-2 das EAAT2 Protein direkt ubiquitiniert (wie z.B. den epithelialen Natriumkanal ENaC [32]), oder ob ein eher komplexeres Regulationsschema mit zwischengeschalteten Proteinen angenommen werden muss. EAAT2 wird zwar durch Nedd4-2 drastisch inhibiert, es konnte jedoch keine direkte Interaktion zwischen EAAT2 und Nedd4-2 nachgewiesen werden. Es ist hierbei aber anzumerken, dass es noch andere Proteine gibt, die auch ohne ein PY-Motiv eine Regulation durch Nedd4-2 zeigen [82], wie z.B. der intestinale Phosphattransporter NaPi IIb.

Wie in **Kapitel 4.2** schon erwähnt, unterliegt das Nedd4-2 Protein einer Phosphorylierung durch SGK. Diese Phosphorylierung beeinträchtigt die Ubiquitinierungsfähigkeit und führt damit zur Einschränkung des inhibitorischen Effekts von Nedd4-2. Damit ist auch verständlich, dass die Koexpression von SGK zu Nedd4-2 dessen inhibitorischen Effekt auf EAAT2 aufhebt. Dabei sind SGK3 und SGK1 in der Lage, die Nedd4-2 Inhibition fast vollständig aufzuheben. SGK2 und PKB sind unfähig, die Nedd4-2 Inhibition signifikant aufzuheben.

Alle drei Isoformen der SGK sowie PKB stimulieren EAAT2. Dieser Effekt kann zumindest teilweise auf die oben erwähnte Inhibition von Nedd4-2

zurückgeführt werden, da Nedd4-2 ja auch endogen in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert wird [32]. Trotzdem ist es sehr wahrscheinlich, dass SGK und PKB den EAAT2 Transport nicht nur allein über die Nedd4-2 Inhibition stimulieren. Eine direkte Stimulation durch Phosphorylierung des EAAT2 Proteins konnte nicht gezeigt werden und ist aufgrund der fehlenden SGK Phosphorylierungs-Site nicht generell annehmbar. Ob an dieser Stimulation andere interagierende Proteine beteiligt sind, ist nicht gezeigt worden und muss weiter untersucht werden.

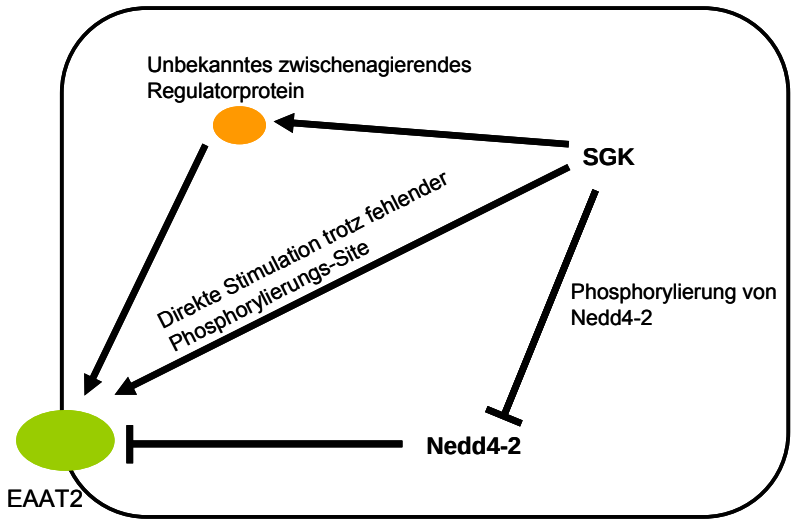

Abbildung 47: Schematisches Modell der EAAT2 Regulation. SGK stimuliert nicht nur exklusiv über die Inhibition von Nedd4-2, sondern hat entweder direkt oder über zwischengeschaltete Proteine stimuliernde Wirkung.

Interessant ist, dass durch Chemolumineszensverfahren zur Detektion der Zelloberflächenexpression des EAAT2 auch gezeigt werden konnte, dass es bei Expression von SGK1 und PKB zu einer vermehrten Expression des EAAT2 Proteins in der Membran der Oozyten kommt [The excitatory amino acid transporter EAAT2 is regulated by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and serum and glucocorticoid inducible kinase SGK. C. Boehmer et al, in revision]. Dies stützt die Hypothese, dass SGK und PKB die Anzahl der EAAT2 Proteine in der Membran vergrößert und dadurch den Glutamattransport stimuliert.

Schon bei EAAT1 konnte die Hypothese herausgearbeitet werden, dass die SGK und Nedd4-2 Regulation von EAAT1 nicht durch Veränderungen der

Transporteigenschaften, sondern durch eine Veränderung der Anzahl der Moleküle in der Membran erreicht wird. Die Chemolumineszenz-Versuche an EAAT2 lassen jetzt die Schlussfolgerung zu, dass diese EAAT1 Hypothese nun auch für EAAT2 übernommen werden kann.
Es kann damit nämlich verdeutlicht werden, dass SGK1 die Proteinmenge des EAAT2 in der Zellmembran stark erhöht, und somit zum verstärkten Glutamattransport führt. Demgegenüber senkt Nedd4-2 die Transporteranzahl der Zellmembran und vermindert damit die Transportfähigkeit.

GTRAP48 wurde erstmals durch Jackson et al als ein Protein identifiziert und kloniert, das in die Regulation des EAAT4 eingreift [55]. Dabei postulierte Jackson, dass GTRAP48 die Verankerung und damit die Stabilität des EAAT4 in der Membran vergrößere. Er konnte zudem eine strikte Kolokalisation dieser zwei Proteine feststellen. GTRAP48 ist aber auch außerhalb des Zerebellums lokalisiert, nämlich im Striatum, Hippokampus und im zerebralen Kortex. In diesen Arealen sind nun auch andere EAAT exprimiert, und so schien es durchaus sinnvoll, eine mögliche Interaktion von GTRAP48 und EAAT2 elektrophysiologisch zu testen. In der Tat, kommt es bei Expression von GTRAP48 und EAAT2 zu einer Stimulation des Glutamattransports. Dieser Effekt kann von der SGK1 sogar noch vergrößert werden. Damit ergibt sich ein weiterer Modus der EAAT2 Regulation durch SGK. Neben Nedd4-2 und anderen intermittierenden Proteinen, kann SGK den GTRAP48 Effekt weiter steigern.
Man kann also abschließend festhalten, dass Nedd4-2 den Glutamattransport hemmt und damit die Glutamat Clearance im synaptischen Spalt verzögert. Dem gegenüber beschleunigt SGK und PKB diese Clearance. Diese Beschleunigung ist nicht nur neuroprotektiv sondern begünstigt zudem die Beendigung des exzitatorischen Signals.

Eine gestörte EAAT2 Funktion wird in Zusammenhang zahlreicher neuronaler Erkrankungen genannt. Eine wichtige, weil schwerwiegende Erkrankung ist die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) [99, 101, 103]. Die ALS geht mit einer

erniedrigten Expression des EAAT2 Proteins einher trotz normaler mRNA Konzentrationen [103]. (Post-)Translationelle Ereignisse müssen bei der ALS also einen pathophysiologischen Einfluss haben [116]. Die Regulation des EAAT2 durch Nedd4-2 und SGK gehört möglicherweise zu diesen (post-) translationellen Prozessen. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass IGF positiven Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung besitzt [65], eine Wirkung die durchaus zumindest teilweise durch Stimulation des Glutamattransports zustande kommen kann. IGF ist ein potentieller Aktivator des PI3-Kinase Signalwegs und damit auch ein Stimulator der SGK- und der PKB-Aktivität. Diese Arbeit kann nun die Beteiligung der SGK und PKB an der IGF-abhängigen Stimulation des Glutamattransports zumindest möglich erscheinen lassen. Diese Steigerung der Glutamataufnahme in die Gliazellen hat neurprotektiven Einfluss und ist somit auch wahrscheinlich an der positiven Wirkung von IGF auf den Verlauf der ALS beteiligt.

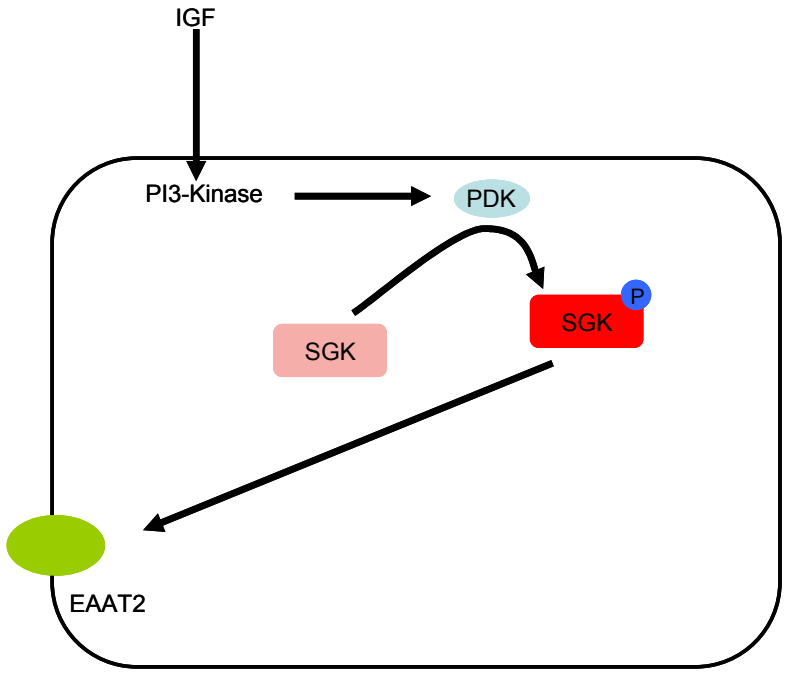

Abbildung 48: Modell einer durch SGK vermittelten positiven Wirkung von IGF auf den Verlauf der ALS. IGF aktiviert über den PI3-Kinase Signalweg die SGK und PKB. Diese stimulieren den EAAT2 Transport und führen damit zu einer erhöhten Glutamat Clearance.

Darüber hinaus lassen sich Störungen in der EAAT2 Funktion noch bei Epilepsie [77, 90], Anfälligkeit gegenüber Alkoholkrankheit [105] und in der HIV-Neuropathie nachweisen. Es konnte gezeigt werden, dass der EAAT2 Transport in mit dem HIV-Virus behandelten fetalen Zelllinien um zirka 59% abnimmt, wobei angenommen wird, dass die EAAT2 Transporteranzahl in der Zellmembran sinkt [131]. Tumornekrosefaktor α ist in der Lage, die Expression des EAAT2 zu vermindern. Es konnte aber kein direkter Einfluss des HIV-Virus auf den Tumornekosefaktor α in fetalen Zelllinien nachgewiesen werden. Trotzdem spielt die Abnahme der EAAT2 und folglich die Abnahme der glialen Glutamat Clearance eine Rolle in der HIV Neuropathie und Enzephalopathie [131].
Bei Schizophrenie konnten erhöhte EAAT2 Expressionslevel im Thalamus [111] und erniedrigte Expressionlevel im Hippokampus [79] gefunden werden.

Auch in der Pathophysiologie der Alzheimer Erkrankung spielt EAAT2 eine überaus wichtige Rolle [52]. Die erhebliche Überproduktion von β-Amyloid führt zur Ausbildung der typischen Amyloid Plaques. Hinzu kommt eine drastische Erniedrigung des neuroprotektiven Fakors BDNF (**b**rain **d**erived **n**eurotropic **f**actor) als weiteres pathophysiologische Kennzeichen der Alzheimer Erkrankung [95]. BDNF wirkt seinerseits wieder stimulierend auf die EAAT2 Expression [95], d.h. das mit der Erniedrigung des BDNF auch eine verringerte EAAT2 Expression zu erwarten ist. BDNF aktiviert den PI-3-Kinase Signalweg und besitzt somit indirekten Einfluss auf SGK und PKB. Sowohl SGK und PKB konnten mit dieser Arbeit als potentielle Stimulatoren des EAAT2 identifiziert werden. Eine Beteiligung dieser Kinasen an der BDNF-verbundenen Pathophysiologie der Alzheimer Erkrankung kann zumindest teilweise angenommen werden.

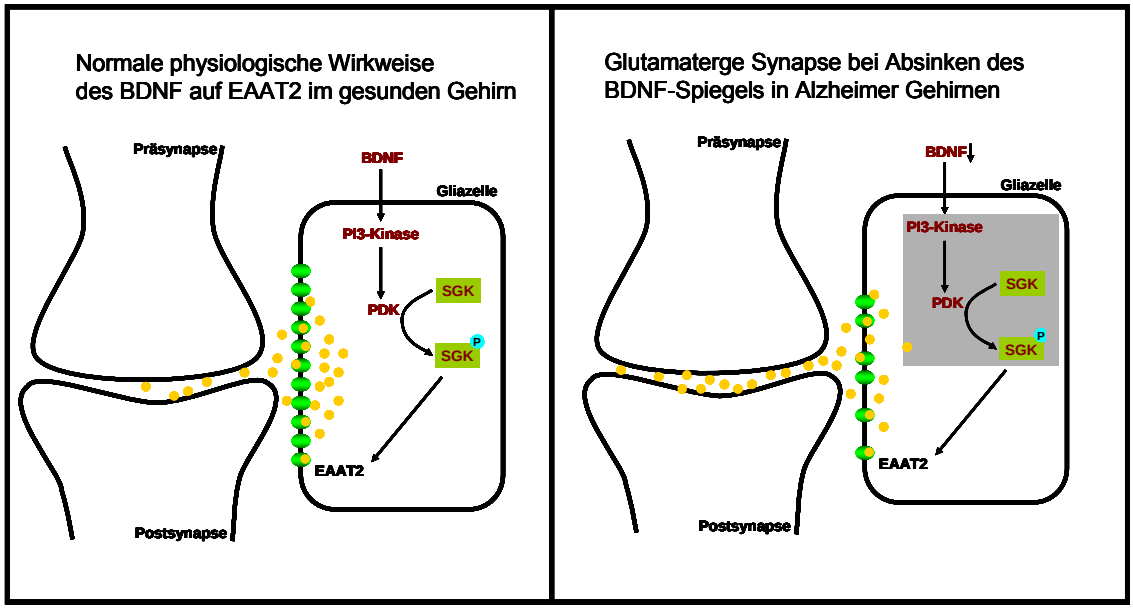

Abbildung 49: BDNFstimuliert über die PI3-Kinase und über SGK und PKB den EAAT2. Ein Absinken des BDNF-Spiegels, wie es bei der Alzheimer Erkrankung bekannt ist, führt über SGK und PKB zur Verminderung des EAAT2 Transports und damit zur Verminderung der Glutamat Clearance.

Ein Verlust der EAAT2 Funktion führt zudem zum Untergang retinaler Ganglienzellen [121].

Nach Schädigungen des Rückenmarks konnte gezeigt werden, dass die EAAT2 Expression ansteigt [120]. Im Falle einer Axotomie steigt die EAAT2 Expression im umgebenden Mikrogliabereich stark an [73]. Zudem ist bei neuronaler Schädigung eine sofortige Stimulation der SGK Transkription bekannt [53]. Die stimulierende Wirkung der SGK auf EAAT2 kann damit ein wesentlicher Bestandteil eines Prozesses sein, der durch vermehrte Glutamataufnahme in die Gliazelle den Neuroneuntergang in dieser Situation zumindest teilweise verhindert.

Ähnlicherweise schützt eine Überexpression von EAAT2 gegen Motoneuron-degeneration und Epilepsie. Auch hier könnten Regulationsvorgänge durch Nedd4-2 oder SGK an der Pathophysiologie dieser Erkrankungen teilnehmen.

EAAT1 und EAAT2 besitzen ein so genanntes Umkehrpotential, bei dem sich der Transport umkehrt. Dieses Potential liegt in einem Bereich, der bei Ischämie

der Zelle erreicht wird. Daraufhin kommt es zu einem Auswärtstransport von Glutamat *in* den synaptischen Spalt und deshalb zum Anstieg der extrazellulären Glutamatkonzentration [35]. Gleichzeitig werden in dieser Situation Stressstimuli frei, die die SGK Expression fördern. Bekannt ist bei Ischämie der Anstieg des Tumornekrosefaktors α [97], der eine stimulierende Wirkung auf die SGK Expression besitzt. Die unter physiologischen Bedingungen durchaus neuroprotektive Stimulation des EAAT1 und EAAT2 Transports durch SGK, führt unter ischämischen Verhältnissen aufgrund der Transportumkehr zum verstärkten Auswärtstransport von Glutamat. Es kommt zu Erhöhung des extrazellulären Glutamats und damit zu neurotoxischen Vorgängen. Dieses Prinzip kann maßgeblich an dem Untergang von Neuronen während ischämischen und postischämischen Zuständen sein.

Die Fähigkeit zur EAAT2 Stimulation wird von den Isoformen 2 und 3 der SGK und von PKB geteilt. Deshalb können diese Isoformen die biologische SGK1 Funktion ersetzen. Dies erklärt, warum die SGK1-Knock-out Maus einen sehr milden Phänotyp zeigt [136]. Das komplette Knock-out der PDK1 (PI-3-Kinase) und damit der Verlust aller aktiven SGKs und PKB ist nicht mit dem Leben vereinbar [68].

4.4 Regulation des EAAT3

Die dargestellten Untersuchungen stellen einen neuartigen Mechanismus der Regulation des EAAT3 Transports dar. Er unterscheidet sich in einigen Punkten von der Regulation des EAAT1 und EAAT2.
Es hat sich bei den elektrophysiologischen Untersuchungen gezeigt, dass EAAT3 durch SGK1 und SGK3 sowie durch PKB auch in Abwesenheit von heterolog exprimiertem Nedd4-2 stimuliert wird. Nedd4-2 kann den Transport des EAAT3 nicht signifikant inhibitieren. Seine Koexpression mit den Kinasen

hat darüberhinaus keinen modifizierenden Einfluss auf deren stimulierende Wirkung. Damit unterscheidet sich der EAAT3 in seiner Regulation ganz erheblich von EAAT1 und EAAT2, bei denen mit dieser Arbeit eine wichtige Inhibition des Glutamattransports durch Nedd4-2 dargestellt werden konnte.
Das EAAT3 Protein besitzt keine SGK Phosphorylierungs-Site, kann also nach heutigem Wissensstand wahrscheinlich nicht durch die SGK direkt phosphoryliert werden. Da eine Regulation des EAAT3 durch Nedd4-2 nicht gezeigt werden konnte, ist die Möglichkeit der SGK Regulation von EAAT3 über die Inhibition von Nedd4-2 nicht gegeben.
Deshalb bleibt das Modell der SGK Regulation von EAAT3 noch überwiegend unklar. In **Abbildung 50** soll ein Modell für die SGK Regulation des EAAT3 gegeben werden. Die direkte Stimulation des EAAT3 durch eine SGK abhängige Phosphorylierung (gepunktet) ist sehr unwahrscheinlich. Es bleiben Signalwege offen, in denen SGK einen EAAT3 stimulierenden Faktor fördert bzw. einen EAAT3 hemmenden Faktor seinerseits inhibiert. Beide Wege führen insgesamt zu einer Stimulation des EAAT3 durch SGK.

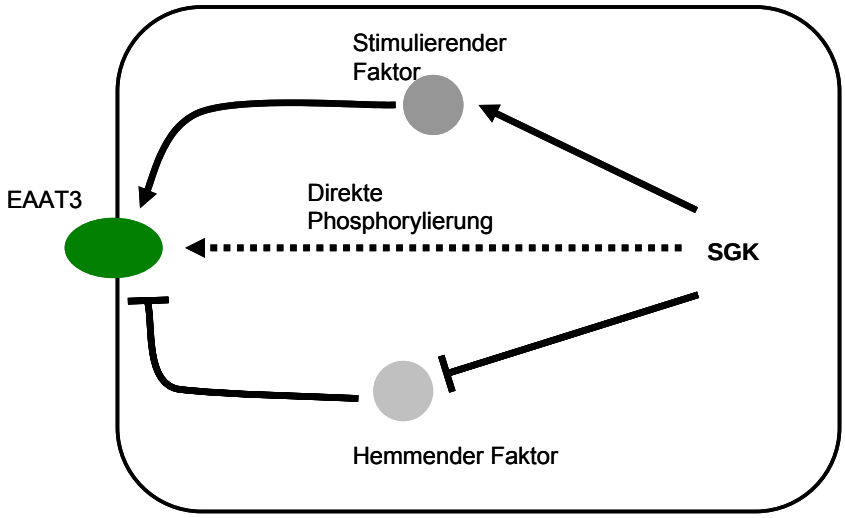

Abbildung 50: Schematisches Modell der SGK Interaktion auf EAAT3
Eine direkte Stimulierung des EAAT3 ist aufgrund der fehlenden SGK Phosphorylierungs-Site sehr unwahrscheinlich. Gleichzeitig fehlt eine Regulation durch Nedd4-2.

GTRAP48, ein Protein, das Membranproteine in der Membran stabilisiert und sie vor dem Abbau schützt [55], enthält, ebenso wie die SGK, eine PDZ-Domäne als Bindungssequenz interagierender Proteine. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass GTRAP48 in der Regulation des EAAT3 eine Rolle zu spielen vermag und dass eine Interaktion mit SGK vorliegt, selbst wenn man bedenkt, dass das EAAT3 Protein keine PDZ-Domäne zur direkten GTRAP48 Interaktion besitzt. Ob endogen exprimiertes GTRAP48 für die SGK Effekte mitverantwortlich ist, kann aber nicht eindeutig behauptet werden, da über die endogene Expression von GTRAP48 bisweilen noch wenig bekannt ist. Möglicherweise ist GTRAP48 ein potentes Beispiel für einen der EAAT3 stimulierende Faktoren in **Abbildung 50**.
In der Retina konnte eine zelluläre Kolokalisation von EAAT3 und SGK1 immunhistochemisch nachgewiesen werden. Vor allem in Neuronen der Ganglienzellschicht und in Amakrinzellen der inneren Körnerschicht findet sich EAAT3 mit SGK1 exprimiert. Auch PKB wurde in der Retina vorkommend entdeckt [15]. Es konnte zudem in einer Kooperation mit der Tübinger Augenklinik gezeigt werden, das brain derived neurotropic factor (BDNF)-defiziente Knock-out Mäuse verminderte retinale Glutamattransportvorgänge besitzen. BDNF ist somit in der Regulation des Glutamattransports involviert. Es hat einen starken stimulierenden Einfluss auf den PI-3-Kinase Signalweg. Ein Signalweg, der sowohl PKB als auch SGK aktiviert (siehe **Kapitel 1.3.3**). Die stimulierende Wirkung des BDNF auf den retinalen Glutamattransport ist teilweise durch die Interaktion von SGK/PKB und EAAT3 erklärbar.

Ganz generell kann man sagen, dass die glutamaterge Neurotransmission der Retina sich von der glutamatergen Neurotransmission im Gehirn unterscheidet. In der äußeren Retina wird Glutamat bei Dunkelheit kontinuierlich von Fotorezeptoren ausgeschüttet. Diese Ausschüttung wird durch Licht moduliert [24, 115]. Dabei generieren die Fotorezeptoren und Bipolarzellen keine Aktionspotentiale, sondern antworten auf Licht mit abgestuften Potentialen, die die Ausschüttung von Glutamat regulieren [93]. Deshalb ist eine strenge und feine Kontrolle der extrazellulären Glutamatkonzentration nicht nur aus

neuroprotektiven Gründen wichtig, sondern auch weil fehlregulierte Glutamatspiegel die lichtabhänige Signaltransduktion stören würden [23].

Der EAAT3 vermittelter Glutamattransport nimmt somit zum einen an neuroprotektiven Aufgaben in der Retina teil. Nervenzellschädigung sowie das tierexperimentelle Glaukom sind an höhere extrazelluläre Glutamat-konzentration gebunden [34, 62].
Externe Zugabe von Glutamat löst den Tod retinaler Ganglienzellen aus [43, 44, 74, 96, 108]. Dabei ist der intrazelluläre Anstieg freier Ca^{2+}-Ionen [80], die Aktivierung von Caspasen [20, 72] und folglich der Apoptosevorgang [71] beteiligt.

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die PKB Aktivität mit dem Überleben retinaler Zellen korelliert [15, 62]. Eine Dephosphorylierung und damit Deaktivierung der PKB kommt dann zustande, wenn Faktoren die eigentlich die PI-3-Kinase aktivieren würden, gehemmt werden. Daraus resultiert dann die Triggerung von Apoptosevorgängen [15] in Zellen der Retina. BDNF ist Stimulator der PI3-Kinase und aktiviert somit SGK und PKB. Offen bleibt die Frage, ob die genannten antiapoptotischen Wirkungen der PKB und SGK über ihre Regulation des EAAT3 zustande kommen. Fest steht, dass nur sehr wenig über die spezifische Rolle des EAAT3 in retinalen Ganglienzellen bekannt ist. EAAT3 Knock-out Mäuse haben keine dramatisch erhöhte retinale Neurodegeneration, zeigen jedoch bei Dicarboxyl-Aminosäure-Diät vermehrt Verhaltensauffälligkeiten und zerebrale Anfälle [100]. Denkbar ist, dass andere Isoformen des EAAT in EAAT3 Knock-out Mäusen den Ausfall des EAAT3 kompensieren.
Eine genaue Festlegung des Stellenwerts der EAAT3 Funktion und damit auch ihrer SGK und PKB Regulation lässt sich nicht treffen.

4.5 Regulation des EAAT5

Der überwiegend retinal exprimierte EAAT5 wird durch SGK und PKB stark beeinflusst.

SGK1, SGK3 sowie PKB können den retinalen Glutamattransport stimulieren. Dabei zeigt sich (ähnlich wie bei EAAT3), dass Nedd4-2 ohne signifikanten Einfluss auf EAAT5 bleibt. Das EAAT5 Protein besitzt zwar ein PY-Motiv für Nedd4-2, wird aber nicht inhibiert. Damit fällt die Möglichkeit der SGK Regulation von EAAT5 via der Inhibition von Nedd4-2 weg.

Eine SGK Phosphorylierungs-Site findet sich im EAAT5 Protein, allerdings ist sie nach aktuell gültiger Membrantopologie extrazellulär lokalisiert. Eine extrazelluläre Phosphorylierung durch SGK ist bis heute noch nicht beschrieben worden und kann mit den hier erhobenen elektrophysiologischen Daten auch nicht postuliert werden. Die direkte Phosphorylierung des EAAT5 durch SGK ist also eher unwahrscheinlich.

Es konnten verschiedene andere Proteine in jüngster Vergangenheit beschrieben werden, die auch ohne SGK Phosphorylierungs-Site eine Regulation durch SGK zeigten [82]. Allein in dieser Arbeit wird verdeutlicht, dass EAAT2 und EAAT3 auch ohne Phosphorylierungs-Site durch SGK beeinflusst werden.

Ein theoretisch denkbares Modell stellt die **Abbildung 51** dar, in der die SGK auf Proteine wirkt, die ihrerseits entweder einen stimulierenden oder inhibitorischen Effekt auf EAAT5 besitzen.

Nach dieser Arbeit bleibt jedoch offen, welche Proteine diese Aufgaben einnehmen können. GTRAP48 und NHERF2 bleiben ohne Effekt auf den EAAT5 Transport, auch wenn SGK koexprimiert wird.

Für weitere Arbeiten ist interessant, dass sowohl EAAT5 als auch die SGK PDZ-Domänen besitzen. Auch wenn eine direkte Interaktion zwischen diesen zwei Proteinen nicht wahrscheinlich ist, kann die Regulation durch SGK an EAAT5 über dritte Proteine vermittelt sein, die höchstwahrscheinlich auch PDZ-Domänen enthalten.

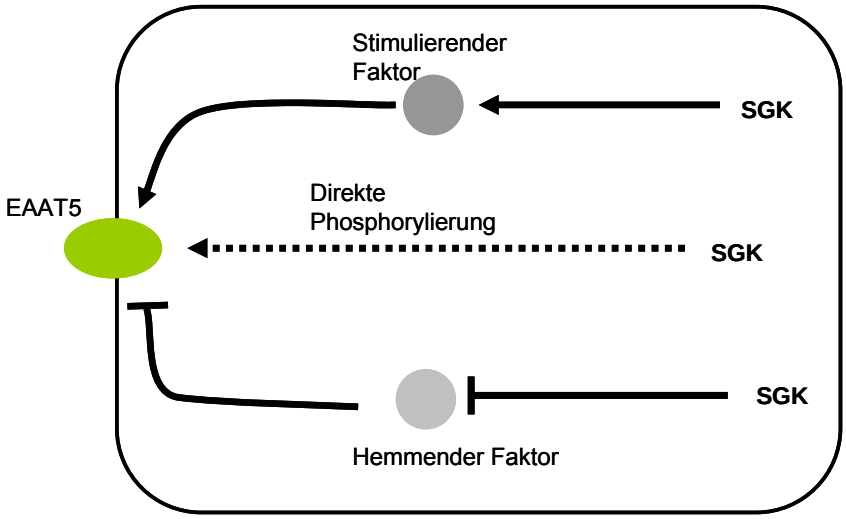

Abbildung 51: Schematische Darstellung der SGK Interaktion auf EAAT5.
Eine direkte Stimulierung des EAAT5 ist aufgrund der extrazellulären SGK Phosphorylierungs-Sites sehr unwahrscheinlich (gepunktete Linie). Ähnlich der Regulation des EAAT3 durch SGK verlangt das Modell für EAAT5 auch zwischengeschaltete regulierende Proteine, die jedoch noch unbekannt sind.

EAAT5 ist retinal in den Fotorezeptoren, Bipolarzellen und in den Müller-Gliazellen lokalisiert. Die Müller-Gliazellen sind wesentlich an der Clearance des synaptischen Spaltes von Glutamat beteiligt. Dort findet man nämlich außer EAAT5 auch EAAT1 exprimiert, der mit seiner großen Glutamattransportkapazität den synaptischen Spalt von Glutamat befreit. Dieser Vorgang führt zu einer Depolarisation der Müller-Gliazelle. Dies wiederum hemmt den EAAT1 Transport. Somit würde die Glutamataufnahme durch EAAT1 sich selbst autoregulieren. EAAT5 besitzt nun aber eine hohe Chlorid-Leitfähigkeit, die bei hohem extrazellulärem Glutamat stark ansteigt. Der Einstrom von Chlorid in die Müller-Gliazelle hyperpolarisiert diese und wirkt damit der EAAT1 Depolarisation entgegen. EAAT5 kann somit die Depolarisation der Müller-Gliazelle vermeiden und erhöht damit die Glutamataufnahmefähigkeit der Müller-Gliazelle. So erhält EAAT5 trotz seiner geringen Glutamattransportkapazität eine wichtige Rolle in der Regulation des extrazellulären Glutamatspiegels.

Extrazelluläre Glutamatkonzentrationen konnten mit Nervenzellschädigung sowie tierexperimentellem Glaukom in Verbindung gebracht werden [34, 62]. In Experimenten konnte durch externe Zugabe von Glutamat der Tod retinaler Ganglienzellen ausgelöst werden [43, 44, 74, 96, 108]. Fehlfunktionen des EAAT5 können durchaus für eine gestörte retinale Glutamathomeostase verantwortlich gemacht werden. In **Kapitel 4.4** wurde ja bereits die Korrelation der PKB-Aktivität mit dem Überleben retinaler Zellen erwähnt [15, 62]. Die Messdaten verdeutlichen den stimulierenden Effekt von PKB auf EAAT5. Dazu kommt dass PKB auch den EAAT2 und EAAT3 Transport stimuliert. Damit ist PKB ein wichtiges stimulierendes Protein des retinalen Glutamattransports, was zumindest teilweise die Korrelation zwischen PKB-Aktivität und Überleben retinaler Zellen erklären kann.

4.6 Integrierende Diskussion der Regulation aller EAAT

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Isoformen der SGK und PKB in ähnlicher und gleichgerichteter Art und Weise auf den Glutamattransport wirken. Zumindest die ausgewählten SGK Isoformen 1 und 3 wirken stimulierend auf den EAAT Transport. PKB stimuliert EAAT2, EAAT3 und EAAT5. Nedd4-2 inhibiert EAAT1und EAAT2.

Die hier gezeigten Daten deuten auf eine Beteiligung der SGK/PKB und des Nedd4-2 an der Regulation des retinalen und zerebralen Glutamattransports hin. Dabei ist zu beachten, dass Glutamat der häufigste exzitatorische Neurotransmitter des menschlichen Gehirns [21] ist.

Die unterschiedliche zelluläre Lokalisation der EAAT definiert ihre physiologische Funktion im Organismus und damit sind die verschiedenen

EAAT auch in die Pathophysiologie zahlreicher unterschiedlicher Erkrankungen involviert.
In der Retina sind EAAT1, eine spezielle Splicevariante des EAAT2 (Glt1b), EAAT3 und EAAT5 lokalisiert. Sie übernehmen dort die Konstanthaltung des extrazellulären Glutamatspiegels und sind damit neuroprotektiv sowie an der Transduktion des glutamatergen Lichtsignals beteiligt. EAAT2, EAAT3 und EAAT5 werden dabei durch PKB stimuliert. PKB korelliert mit dem Überleben retinaler Zellen und schützt vor retinaler Apoptose [15]. BDNF stimuliert den Glutamattransport und es konnte in Retinae der Ratten gezeigt werden, dass BDNF-Knock-out Mäuse einen verminderten EAAT3 Transport besitzen [107]. BDNF aktiviert über den PI3-Kinase Signalweg sowohl SGK als auch PKB. Das bedeutet, dass die BDNF-Wirkung auf den retinalen Glutamattransport zumindest teilweise durch SGK und PKB vermittelt sein kann.

Auch außerhalb der Retina spielen die EAAT eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie zahlreicher neurodegenerativer Erkrankungen.
Die infaust verlaufende ALS wird durch Veränderungen im EAAT1 und EAAT2 Transport verursacht. Beide Transporter werden durch SGK stimuliert und durch die Ubiquitinligase Nedd4-2 inhibiert. IGF zeigte in einer klinischen Studie bei der ALS einen positiven Effekt auf die Krankheitsprogression. Dabei stimuliert IGF den EAAT1 und EAAT2 Transport durch Aktivierung der PI3-Kinase und folglich der SGK und PKB Aktivität [65].
Das Absinken der BDNF Konzentration bei Patienten mit Alzheimer Erkrankung ist durch Rodriguez-Kern [95] gezeigt und in den Zusammenhang zum Absinken des Glutamattransports gebracht worden. Diese Arbeit verdeutlicht nun, dass die SGK als Komponente des PI3-Kinase Signalwegs an der BDNF-abhängigen Pathophysiologie der Alzheimer Erkrankung beteiligt sein kann.

Aber auch in vielen anderen zahlreichen Erkrankungen wie Schizophrenie, Epilepsie, HIV-Neuropathie und andere sind die EAAT involviert. Eine Regulation durch SGK/PKB und Nedd4-2 kann zwar mit dieser Arbeit nicht

pathophysiologisch eingeordnet werden, ist aber für zukünftige Untersuchungen ein sinnvoller Ansatzpunkt.

Abschließend lässt sich sagen, dass SGK/PKB und Nedd4-2 eine entscheidende Rolle in der Regulation des wichtigsten Neurotransmittersystems des menschlichen Gehirns spielen. SGK/PKB vergrößert dabei die Glutamataufnahme und Clearance aus dem synaptischen Spalt und wirkt damit neuroprotektiv. Nedd4-2, das den Glutamat Transport von EAAT1 und EAAT2 verringert, hat genau den gegenläufigen Effekt.

5. Zusammenfassung

Mit dieser Arbeit konnten weitergehende Aufschlüsse über die Rolle der Serum- und Glukokortikoid-induzierten Kinase SGK auf die Regulation grundlegender Zellfunktionen gewonnen werden:

1. SGK1 stimuliert die Glutamattransporter EAAT1, EAAT2, EAAT3 und EAAT5
2. SGK2 stimuliert EAAT2
3. SGK3 stimuliert die Glutamattransporter EAAT1, EAAT2, EAAT3 und EAAT5
4. PKB stimuliert EAAT2, EAAT3 und EAAT5
5. Die Ubiquitinligase Nedd4-2 hemmt den Transport des EAAT1 und EAAT2
6. Die kinetischen Eigenschaften des EAAT1 werden durch SGK nicht beeinflusst.
7. SGK1 und EAAT3 sind retinal kolokalisiert.

Die genaue Funktionsweise der SGK Regulation ist an den verschiedenen EAAT unterschiedlich. Eine direkte Phosphorylierung des Transporters konnte nur bei EAAT1 nachgewiesen werden. Dort wurde auch die inhibitorische Wirkung der SGK auf die Ubiquitinligase Nedd4-2 gezeigt.
Nedd4-2 inhibiert die Transporter EAAT1 und EAAT2, obwohl eine direkte Ubiquitinierung aufgrund des fehlenden PY-Motivs eher unwahrscheinlich ist.
SGK kann Transporter auch durch Verminderung des inhibitorischen Nedd4-2 Effekts regulieren. Dieser Mechanismus ist vor allem bei EAAT2 von Bedeutung, da dieser Transporter keine SGK Phosphorylierungs-Site besitzt.

Die Ergebnisse demonstrieren eine Beteiligung der SGK an der Regulation des Glutamattransports im Gehirn und in der Retina. Damit ist auch ein Einfluss der

SGK auf die Pathophysiologie zahlreicher neurologischer, ophtalmologischer und psychatrischer Erkrankungen wahrscheinlich.

Trotz dieser Ergebnisse bleiben über das genaue Interaktionsmuster von SGK und EAAT viele Fragen offen. Ziel weiterer Arbeiten wird es jetzt sein, diese Interaktionsvorgänge näher zu beleuchten und eventuelle Proteine, die in diese Regulationsvorgänge involviert sind, zu identifizieren und zu charakterisieren.

6. Literatur

6.1 Zitierbare Abstracts

(1) Wagner, S.; Böhmer, C.; Henke, G.; Schniepp, R.; Lang, F. Regulation of the glutamate transporter EAAT1 by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and the serum and glucocorticoid inducible kinase isoforms SGK1-3 and the protein kinase B

(2) Schniepp, R.; Henke, G.; Böhmer, C.; Bröer, S.; Lang, F. Glutamate transporter EAAT2 regulation by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and the kinase SGK1

(3) Kostelac, K.; Henke, G.; Böhmer, C.; Bröer, S.; Lang, F. The kinase SGK1 regulates the glutamate transporter EAAT3

(4) Akel, A.; Schniepp, R.; Kohler, K.; Böhmer, C.; Lang, F. The retinal glutamate transporter EAAT3 is stimulated by the serum and glucocorticoid inducible kinase SGK1 and the related kinase PKB

(5) Schniepp, R.; Palmada, M.; Böhmer, C.; Lang, F. The serum and glucocorticoid inducible kinase SGK1 stimulates the glutamate transporter EAAT5

6.2 Publikationsverzeichnis

(1) Boehmer, C.; Henke, G.; Schniepp, R.; Palmada, M.; Rothstein, J.D.; Broer, S.; Lang, F. Regulation of the glutamate transporter EAAT1 by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and the serum and glucocorticoid-inducible kinase isoforms SGK1/3 and protein kinase B. *J.Neurochem.* **2003**, 86, 1181-1188

(2) Boehmer, C.; Palmada, M.; Rajamanickam, J; Schniepp, R.; Amare, S.; Lang, F. Post-translational regulation of EAAT2 function by co-expressed ubiquitin ligase Nedd4-2 is impacted by SGK kinases. *J.Neurochem.* **2006**, 97(4), 911-921

(3) Schniepp, R., Kohler, K., Ladewig, T., Guenther, E., Henke, G., Palmada, M., Boehmer, C., Rothstein J.D., Broer S., Lang F. Retinal colocalization and in vitro interaction of the glutamate transporter EAAT3 and the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* **2004**, 45, 1442-1449

(4) Boehmer, C.; Phillipin, M.; Rajamanickam, J.; Mack, A.; Broer, S.; Palmada, M.; Hediger, M.A.; Lang, F. Postranslational modulation of the EAAT4 glutamate transporter by SGK protein kinases. *Biochem.Biophys.Res. Commun.*, eingereicht

(5) Boehmer, C.; Rjamanickam, J.; Schniepp, R.; Kohler, K.; Wulff, P.; Kuhl, D.; Palmada, M.; Lang, F. Regulation of the excitatory amino acid transporter EAAT5 by the serum and glucocorticoid dependent kinases SGK1 and SGK3. *Biochem.Biophys.Res. Commun.* **2005,** 329, 746-750

6.3 Literaturverzeichnis

1 B. Alberts, D. M. Bray, J. Lewis, M. Raff and K. W. J. Roberts, Molecular Biology of the cell, Garland Publishing, London 2002.

2 Alvarez-Leefmans FJ: Extracellular reference electrodes; in Grantyn R, Kettenmann H (eds): *Practical Electrophysiological Methods: A guide for in vitro studies in vertebrate neurobiology.* New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, John Wiley Sons Inc., 1992, pp 171-182.

3 Anan T, Nagata Y, Koga H, Honda Y, Yabuki N, Miyamoto C, Kuwano A, Matsuda I, Endo F, Saya H, Nakao M (1998). Human ubiquitin-protein ligase Nedd4: expression, subcellular localization and selective interaction with ubiquitin-conjugating enzymes. **Genes Cells**; 3:751-763.

4 Arai H, Kobayashi, K., Ichimiya, Y., Kosaka K, Iisuka R (1985). Free amino acids in post-mortem cerebral cortices from patients with Alzheimer-type demtia. **Neurosci Res**; 2:486-490.

5 Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG (1997). Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. **Proc Natl Acad Sci U S A**; 94:4155-4160.

6 Asher C, Sinha I, Garty H (2003). Characterization of the interactions between Nedd4-2, ENaC, and sgk-1 using surface plasmon resonance. **Biochim Biophys Acta**; 1612:59-64.

7 Barbour B, Brew H, Attwell D (1988). Electrogenic glutamate uptake in glial cells is activated by intracellular potassium. **Nature**; 335:433-435.

8 Bell LM, Leong ML, Kim B, Wang E, Park J, Hemmings BA, Firestone GL (2000). Hyperosmotic stress stimulates promoter activity and regulates cellular utilization of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase (Sgk) by a p38 MAPK-dependent pathway. **J Biol Chem**; 275:25262-25272.

9 Berardi S, Hagenbuch B, Carafoli E, Krahenbuhl S (1995). Characterization of the endogenous carnitine transport and expression of a rat renal Na(+)-dependent carnitine transport system in Xenopus laevis oocytes. **Biochem J**; 309 (Pt 2):389-393.

10 Berkowitz BA, Bevins CL, Zasloff MA (1990). Magainins: a new family of membrane-active host defense peptides. **Biochem Pharmacol**; 39:625-629.

11 Bhargava A, Fullerton MJ, Myles K, Purdy TM, Funder JW, Pearce D, Cole TJ (2001). The serum- and glucocorticoid-induced kinase is a physiological mediator of aldosterone action. **Endocrinology**; 142:1587-1594.

12 Brennan FE, Fuller PJ (2000). Rapid upregulation of serum and glucocorticoid-regulated kinase (sgk) gene expression by corticosteroids in vivo. **Mol Cell Endocrinol**; 166:129-136.

13 Bristol LA, Rothstein JD (1996). Glutamate transporter gene expression in amyotrophic lateral sclerosis motor cortex. **Ann Neurol**; 39:676-679.

14 Brunet A, Park J, Tran H, Hu LS, Hemmings BA, Greenberg ME (2001). Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHRL1 (FOXO3a). **Mol Cell Biol**; 21:952-965.

15 Campos CB, Bedard PA, Linden R (2003). Selective involvement of the PI3K/PKB/bad pathway in retinal cell death. **J Neurobiol**; 56:171-177.

16 Cedarbaum JM, Sheu LFR, Harding BJ, Blass JP, Javoy-Agid F, Agid Y (1990). Deficiency of glutamate dehydrogenase in postmortem brain samples from parkinsonian putamen. **Annals Neurol**; 28(1):111-112.

17 Chan H, Hazell AS, Desjardins P, Butterworth RF (2000). Effects of ammonia on glutamate transporter (GLAST) protein and mRNA in cultured rat cortical astrocytes. **Neurochem Int**; 37:243-248.

18 Chaudhry FA, Lehre KP, van Lookeren CM, Ottersen OP, Danbolt NC, Storm-Mathisen J (1995). Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. **Neuron**; 15:711-720.

19 Chen SY, Bhargava A, Mastroberardino L, Meijer OC, Wang J, Buse P, Firestone GL, Verrey F, Pearce D (1999). Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk. **Proc Natl Acad Sci U S A**; 96:2514-2519.

20 Chen TA, Yang F, Cole GM, Chan SO (2001). Inhibition of caspase-3-like activity reduces glutamate induced cell death in adult rat retina. **Brain Res**; 904:177-188.

21 Choi DW (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. **Neuron**; 1:623-634.

22 Cohen SN, Chang AC, Hsu L (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. **Proc Natl Acad Sci U S A**; 69:2110-2114.

23 Copenhagen DR, Ashmore JF, Schnapf JK (1983). Kinetics of synaptic transmission from photoreceptors to horizontal and bipolar cells in turtle retina. **Vision Res**; 23:363-369.

24 Copenhagen DR, Jahr CE (1989). Release of endogenous excitatory amino acids from turtle photoreceptors. **Nature**; 341:536-539.

25 Cross AJ, Slater P, Reynolds GP (1986). Reduced high affinity glutamate uptake sites in the brains of patients with Huntington`s disease. **Neurosci Lett**; 67:198-202.

26 Dai F, Yu L, He H, Zhao Y, Yang J, Zhang X, Zhao S (1999). Cloning and mapping of a novel human serum/glucocorticoid regulated kinase-like gene, SGKL, to chromosome 8q12.3-q13.1. **Genomics**; 62:95-97.

27 Daikhin Y, Yudkoff M (2000). Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. **J Nutr**; 130:1026S-1031S.

28 Danbolt NC, Storm-Mathisen J, Kanner BI (1992). An [Na+ + K+]coupled L-glutamate transporter purified from rat brain is located in glial cell processes. **Neuroscience**; 51:295-310.

29 Dascal N (1987). The use of Xenopus oocytes for the study of ion channels. **CRC Crit Rev Biochem**; 22:317-387.

30 Dawid IB, Rebbert ML, Rosa F, Jamrich M, Sargent TD (1988). Gene expression in amphibian embryogenesis. **Cell Differ Dev**; 25 Suppl:67-74.

31 Dawid IB, Sargent TD (1988). Xenopus laevis in developmental and molecular biology. **Science**; 240:1443-1448.

32 Debonneville C, Flores SY, Kamynina E, Plant PJ, Tauxe C, Thomas MA, Munster C, Chraibi A, Pratt JH, Horisberger JD, Pearce D, Loffing J, Staub O (2001). Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na(+) channel cell surface expression. **EMBO J**; 20:7052-7059.

33 Dietzel ID, Bruns D, Polder HR, Lux HD: Voltage clamp recording; in Grantyn R, Kettenmann H (eds): *Practical Electrophysiological Methods: A*

guide for in vitro studies in vertebrate neurobiology. New York; Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, John Wiley Sons Inc., 1992, pp 256-262.

34 Dkhissi O, Chanut E, Wasowicz M, Savoldelli M, Nguyen-Legros J, Minvielle F, Versaux-Botteri C (1999). Retinal TUNEL-positive cells and high glutamate levels in vitreous humor of mutant quail with a glaucoma-like disorder. **Invest Ophthalmol Vis Sci**; 40:990-995.

35 Douen AG, Akiyama K, Hogan MJ, Wang F, Dong L, Chow AK, Hakim A (2000). Preconditioning with cortical spreading depression decreases intraischemic cerebral glutamate levels and down-regulates excitatory amino acid transporters EAAT1 and EAAT2 from rat cerebal cortex plasma membranes. **J Neurochem**; 75:812-818.

36 Embark HM, Bohmer C, Vallon V, Luft F, Lang F (2003). Regulation of KCNE1-dependent K(+) current by the serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) isoforms. **Pflugers Arch**; 445:601-606.

37 Fairman WA, Vandenberg RJ, Arriza JL, Kavanaugh MP, Amara SG (1995). An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. **Nature**; 375:599-603.

38 Faletti CJ, Perrotti N, Taylor SI, Blazer-Yost BL (2002). sgk: an essential convergence point for peptide and steroid hormone regulation of ENaC-mediated Na+ transport. **Am J Physiol Cell Physiol**; 282:C494-C500.

39 Fan JS, Zhang M (2002). Signaling complex organization by PDZ domain proteins. **Neurosignals**; 11:315-321.

40 Firestone GL, Giampaolo JR, O'Keeffe BA (2003). Stimulus-dependent regulation of serum and glucocorticoid inducible protein kinase (SGK) transcription, subcellular localization and enzymatic activity. **Cell Physiol Biochem**; 13:1-12.

41 Furuta A, Martin LJ, Lin CL, Dykes-Hoberg M, Rothstein JD (1997). Cellular and synaptic localization of the neuronal glutamate transporters excitatory amino acid transporter 3 and 4. **Neuroscience**; 81:1031-1042.

42 Gamboa C, Ortega A (2002). Insulin-like growth factor-1 increases activity and surface levels of the GLAST subtype of glutamate transporter. **Neurochem Int**; 40:397-403.

43 Goto W, Ota T, Morikawa N, Otori Y, Hara H, Kawazu K, Miyawaki N, Tano Y (2002). Protective effects of timolol against the neuronal damage induced by glutamate and ischemia in the rat retina. **Brain Res**; 958:10-19.

44 Gross RL, Hensley SH, Gao F, Yang XL, Dai SC, Wu SM (2000). Effects of betaxolol on light responses and membrane conductance in retinal ganglion cells. **Invest Ophthalmol Vis Sci**; 41:722-728.

45 J. B. Gurdon, Introductory comments: Xenopus as a laboratory animal, pp. 3-6, Clarendon press, 1996.

46 Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR, Marbaix G (1971). Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. **Nature**; 233:177-182.

47 Hayashi M, Tapping RI, Chao TH, Lo JF, King CC, Yang Y, Lee JD (2001). BMK1 mediates growth factor-induced cell proliferation through direct cellular activation of serum and glucocorticoid-inducible kinase. **J Biol Chem**; 276:8631-8634.

48 Hayashi T (1954). **Keio J Med 3**183-192.

49 Henke G, Maier G, Wallisch S, Boehmer C, Lang F (2004). Regulation of the voltage gated K+ channel Kv1.3 by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and the serum and glucocorticoid inducible kinase SGK1. **J Cell Physiol**; 199:194-199.

50 B. Hille, Ionic channels of excitable membranes, Sinauer Associates, Inc., Sunderland 1992.

51 Hofmann K, Duker M, Fink T, Lichter P, Stoffel W (1994). Human neutral amino acid transporter ASCT1: structure of the gene (SLC1A4) and localization to chromosome 2p13-p15. **Genomics**; 24:20-26.

52 Honig LS, Chambliss DD, Bigio EH, Carroll SL, Elliott JL (2000). Glutamate transporter EAAT2 splice variants occur not only in ALS, but also in AD and controls. **Neurology**; 55:1082-1088.

53 Imaizumi K, Tsuda M, Wanaka A, Tohyama M, Takagi T (1994). Differential expression of sgk mRNA, a member of the Ser/Thr protein kinase gene family, in rat brain after CNS injury. **Brain Res Mol Brain Res**; 26:189-196.

54 Ingram EM, Wiseman JW, Tessler S, Emson PC (2001). Reduction of glial glutamate transporters in the parietal cortex and hippocampus of the EL mouse. **J Neurochem**; 79:564-575.

55 Jackson M, Song W, Liu MY, Jin L, Dykes-Hoberg M, Lin CI, Bowers WJ, Federoff HJ, Sternweis PC, Rothstein JD (2001). Modulation of the neuronal glutamate transporter EAAT4 by two interacting proteins. **Nature**; 410:89-93.

56 Jolliffe CN, Harvey KF, Haines BP, Parasivam G, Kumar S (2000). Identification of multiple proteins expressed in murine embryos as binding partners for the WW domains of the ubiquitin-protein ligase Nedd4. **Biochem J**; 351 Pt 3:557-565.

57 Kamynina E, Staub O (2002). Concerted action of ENaC, Nedd4-2, and Sgk1 in transepithelial Na(+) transport. **Am J Physiol Renal Physiol**; 283:F377-F387.

58 Kanai Y, Bhide PG, DiFiglia M, Hediger MA (1995). Neuronal high-affinity glutamate transport in the rat central nervous system. **Neuroreport**; 6:2357-2362.

59 Kanai Y, Hediger MA (1992). Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. **Nature**; 360:467-471.

60 Kanelis V, Rotin D, Forman-Kay JD (2001). Solution structure of a Nedd4 WW domain-ENaC peptide complex. **Nat Struct Biol**; 8:407-412.

61 Kanner BI, Sharon I (1978). Active transport of L-glutamate by membrane vesicles isolated from rat brain. **Biochemistry**; 17:3949-3953.

62 Klocker N, Kermer P, Weishaupt JH, Labes M, Ankerhold R, Bahr M (2000). Brain-derived neurotrophic factor-mediated neuroprotection of adult rat retinal ganglion cells in vivo does not exclusively depend on phosphatidyl-inositol-3'-kinase/protein kinase B signaling. **J Neurosci**; 20:6962-6967.

63 Kobayashi T, Cohen P (1999). Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositide 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2. **Biochem J**; 339 (Pt 2):319-328.

64 Kobayashi T, Deak M, Morrice N, Cohen P (1999). Characterization of the structure and regulation of two novel isoforms of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase. **Biochem J**; 344 Pt 1:189-197.

65 Lai EC, Felice KJ, Festoff BW, Gawel MJ, Gelinas DF, Kratz R, Murphy MF, Natter HM, Norris FH, Rudnicki SA (1997). Effect of recombinant human insulin-like growth factor-I on progression of ALS. A placebo-controlled study. The North America ALS/IGF-I Study Group. **Neurology**; 49:1621-1630.

66 Lang F, Cohen P (2001). Regulation and physiological roles of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase isoforms. **Sci STKE**; 2001:RE17.

67 Lang F, Henke G, Embark HM, Waldegger S, Palmada M, Bohmer C, Vallon V (2003). Regulation of channels by the serum and glucocorticoid-inducible kinase - implications for transport, excitability and cell proliferation. **Cell Physiol Biochem**; 13:41-50.

68 Lawlor MA, Mora A, Ashby PR, Williams MR, Murray-Tait V, Malone L, Prescott AR, Lucocq JM, Alessi DR (2002). Essential role of PDK1 in regulating cell size and development in mice. **EMBO J**; 21:3728-3738.

69 Lehre KP, Levy LM, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC (1995). Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. **J Neurosci**; 15:1835-1853.

70 Leong ML, Maiyar AC, Kim B, O'Keeffe BA, Firestone GL (2003). Expression of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase, Sgk, is a cell survival response to multiple types of environmental stress stimuli in mammary epithelial cells. **J Biol Chem**; 278:5871-5882.

71 Li Y, Schlamp CL, Nickells RW (1999). Experimental induction of retinal ganglion cell death in adult mice. **Invest Ophthalmol Vis Sci**; 40:1004-1008.

72 Li Y, Schlamp CL, Poulsen GL, Jackson MW, Griep AE, Nickells RW (2002). p53 regulates apoptotic retinal ganglion cell death induced by N-methyl-D-aspartate. **Mol Vis**; 8:341-350.

73 Lopez-Redondo F, Nakajima K, Honda S, Kohsaka S (2000). Glutamate transporter GLT-1 is highly expressed in activated microglia following facial nerve axotomy. **Brain Res Mol Brain Res**; 76:429-435.

74 Luo X, Heidinger V, Picaud S, Lambrou G, Dreyfus H, Sahel J, Hicks D (2001). Selective excitotoxic degeneration of adult pig retinal ganglion cells in vitro. **Invest Ophthalmol Vis Sci**; 42:1096-1106.

75 Marangos WF, Greenamyre JT, Penny JB, Young, A.B. (1987). Glutamate dysfuncton in Alzheimer´s disease: an hypthesis. **Trends Neurosci**; 10:65-68.

76 Masson L (1999). [LATINFOODS and its role in the generation and compilation of data for Latin America]. **Arch Latinoam Nutr**; 49:89S-91S.

77 Meldrum BS, Akbar MT, Chapman AG (1999). Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy. **Epilepsy Res**; 36:189-204.

78 Mikosz CA, Brickley DR, Sharkey MS, Moran TW, Conzen SD (2001). Glucocorticoid receptor-mediated protection from apoptosis is associated with induction of the serine/threonine survival kinase gene, sgk-1. **J Biol Chem**; 276:16649-16654.

79 Ohnuma T, Tessler S, Arai H, Faull RL, McKenna PJ, Emson PC (2000). Gene expression of metabotropic glutamate receptor 5 and excitatory amino acid transporter 2 in the schizophrenic hippocampus. **Brain Res Mol Brain Res**; 85:24-31.

80 Otori Y, Kusaka S, Kawasaki A, Morimura H, Miki A, Tano Y (2003). Protective effect of nilvadipine against glutamate neurotoxicity in purified retinal ganglion cells. **Brain Res**; 961:213-219.

81 Palacin M, Estevez R, Bertran J, Zorzano A (1998). Molecular Biology of Mammalian Plasma Membrane Amino Acid Transporters. **Physiol Rev**; 78:969-1054.

82 Palmada M, Dieter M, Speil A, Embark H, Bohmer C, Mack AF, Wagner HJ, Klingel K, Kandolf R, Murer H, Biber J, Closs EI, Lang F (2004). Regulation of the intestinal phoshpate transporter NaPi IIb by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and the serum and glucocorticoid dependent kinase SGK1. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**

83 Palmada M, Embark HM, Yun C, Bohmer C, Lang F (2003). Molecular requirements for the regulation of the renal outer medullary K(+) channel ROMK1 by the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. **Biochem Biophys Res Commun**; 311:629-634.

84 Park J, Leong ML, Buse P, Maiyar AC, Firestone GL, Hemmings BA (1999). Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway. **EMBO J**; 18:3024-3033.

85 Park J, Leong ML, Buse P, Maiyar AC, Firestone GL, Hemmings BA (1999). Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway. **EMBO J**; 18:3024-3033.

86 Pearce D (2003). SGK1 regulation of epithelial sodium transport. **Cell Physiol Biochem**; 13:13-20.

87 Perrotti N, He RA, Phillips SA, Haft CR, Taylor SI (2001). Activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase (Sgk) by cyclic AMP and insulin. **J Biol Chem**; 276:9406-9412.

88 Perry TL, Hansen S (1990). Whant excitotoxin kills striatal neurons in Huntington´s disease? Clues from neurochemical studies. **Neurology**; 40:20-24.

89 Pines G, Danbolt NC, Bjoras M, Zhang Y, Bendahan A, Eide L, Koepsell H, Storm-Mathisen J, Seeberg E, Kanner BI (1992). Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. **Nature**; 360:464-467.

90 Proper EA, Hoogland G, Kappen SM, Jansen GH, Rensen MG, Schrama LH, van Veelen CW, van Rijen PC, van Nieuwenhuizen O, Gispen WH, de Graan PN (2002). Distribution of glutamate transporters in the hippocampus of patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy. **Brain**; 125:32-43.

91 Rauen T (2000). Diversity of glutamate transporter expression and function in the mammalian retina. **Amino Acids**; 19:53-62.

92 Rauen T, Rothstein JD, Wassle H (1996). Differential expression of three glutamate transporter subtypes in the rat retina. **Cell Tissue Res**; 286:325-336.

93 Rauen T, Taylor WR, Kuhlbrodt K, Wiessner M (1998). High-affinity glutamate transporters in the rat retina: a major role of the glial glutamate transporter GLAST-1 in transmitter clearance. **Cell Tissue Res**; 291:19-31.

94 Reynolds GP, Pearson SJ (1987). Decreased glutamic acid and increased 5-hydroxytryptamine in Huntington´s disease brain. **Neurosci Lett**; 78:233-238.

95 Rodriguez-Kern A, Gegelashvili M, Schousboe A, Zhang J, Sung L, Gegelashvili G (2003). Beta-amyloid and brain-derived neurotrophic factor, BDNF, up-regulate the expression of glutamate transporter GLT-1/EAAT2 via different signaling pathways utilizing transcription factor NF-kappaB. **Neurochem Int**; 43:363-370.

96 Romano C, Price MT, Almli T, Olney JW (1998). Excitotoxic neurodegeneration induced by deprivation of oxygen and glucose in isolated retina. **Invest Ophthalmol Vis Sci**; 39:416-423.

97 Romera C, Hurtado O, Botella SH, Lizasoain I, Cardenas A, Fernandez-Tome P, Leza JC, Lorenzo P, Moro MA (2004). In vitro ischemic tolerance involves upregulation of glutamate transport partly mediated by the TACE/ADAM17-tumor necrosis factor-alpha pathway. **J Neurosci**; 24:1350-1357.

98 Rosen DR (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. **Nature**; 364:362.

99 Rothstein JD (1995). Excitotoxicity and neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. **Clin Neurosci**; 3:348-359.

100 Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF (1996). Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. **Neuron**; 16:675-686.

101 Rothstein JD, Kuncl R, Chaudhry V, Clawson L, Cornblath DR, Coyle JT, Drachman DB (1991). Excitatory amino acids in amyotrophic lateral sclerosis: an update. **Ann Neurol**; 30:224-225.

102 Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, Nash N, Kuncl RW (1994). Localization of neuronal and glial glutamate transporters. **Neuron**; 13:713-725.

103 Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW (1995). Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. **Ann Neurol**; 38:73-84.

104 J. Sambrook, E. F. Fritsch and J. Manil, Molecular cloning: A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

105 Sander T, Ostapowicz A, Samochowiec J, Smolka M, Winterer G, Schmidt LG (2000). Genetic variation of the glutamate transporter EAAT2 gene and vulnerability to alcohol dependence. **Psychiatr Genet**; 10:103-107.

106 Sattler R, Tymianski M (2000). Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. **J Mol Med**; 78:3-13.

107 Schniepp R, Kohler K, Ladewig T, Guenther E, Henke G, Palmada M, Boehmer C, Rothstein JD, Broer S, Lang F (2004). Retinal colocalization and in vitro interaction of the glutamate receptor EAAT3 and the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. **Invest Ophthalmol Vis Sci**; 45:1442-1449.

108 Schori H, Kipnis J, Yoles E, WoldeMussie E, Ruiz G, Wheeler LA, Schwartz M (2001). Vaccination for protection of retinal ganglion cells against death from glutamate cytotoxicity and ocular hypertension: implications for glaucoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**; 98:3398-3403.

109 W. Schwarzer and J. Rettinger, Foundations in Electrophysiology, Shaker Verlag, Aachen 2000.

110 Smith LD, Xu WL, Varnold RL (1991). Oogenesis and oocyte isolation. **Methods Cell Biol**; 36:45-60.

111 Smith RE, Haroutunian V, Davis KL, Meador-Woodruff JH (2001). Expression of excitatory amino acid transporter transcripts in the thalamus of subjects with schizophrenia. **Am J Psychiatry**; 158:1393-1399.

112 Soreq H (1985). The biosynthesis of biologically active proteins in mRNA-microinjected Xenopus oocytes. **CRC Crit Rev Biochem**; 18:199-238.

113 Storck T, Schulte S, Hofmann K, Stoffel W (1992). Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**; 89:10955-10959.

114 Suzuki K, Ikegaya Y, Matsuura S, Kanai Y, Endou H, Matsuki N (2001). Transient upregulation of the glial glutamate transporter GLAST in response to fibroblast growth factor, insulin-like growth factor and epidermal growth factor in cultured astrocytes. **J Cell Sci**; 114:3717-3725.

115 Trifonov YA (1968). Study of synaptic transmission between the photoreceptor and the horizontal cell using electrical stimulation of the retina. **Biofizika**; 13:809-817.

116 Trotti D, Rolfs A, Danbolt NC, Brown RH, Jr., Hediger MA (1999). SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter. **Nat Neurosci**; 2:848.

117 Ueda Y, Doi T, Tokumaru J, Yokoyama H, Nakajima A, Mitsuyama Y, Ohya-Nishiguchi H, Kamada H, Willmore LJ (2001). Collapse of extracellular glutamate regulation during epileptogenesis: down-regulation and functional failure of glutamate transporter function in rats with chronic seizures induced by kainic acid. **J Neurochem**; 76:892-900.

118 Ueda Y, Willmore LJ (2000). Molecular regulation of glutamate and GABA transporter proteins by valproic acid in rat hippocampus during epileptogenesis. **Exp Brain Res**; 133:334-339.

119 Velaz-Faircloth M, McGraw TS, alandro MS, Fremeau RT, Jr., Kilberg MS, Anderson KJ (1996). Characterization and distribution of the neuronal glutamate transporter EAAC1 in rat brain. **Am J Physiol**; 270:C67-C75.

120 Vera-Portocarrero LP, Mills CD, Ye Z, Fullwood SD, McAdoo DJ, Hulsebosch CE, Westlund KN (2002). Rapid changes in expression of glutamate transporters after spinal cord injury. **Brain Res**; 927:104-110.

121 Vorwerk CK, Naskar R, Schuettauf F, Quinto K, Zurakowski D, Gochenauer G, Robinson MB, Mackler SA, Dreyer EB (2000). Depression of retinal glutamate transporter function leads to elevated intravitreal glutamate levels and ganglion cell death. **Invest Ophthalmol Vis Sci**; 41:3615-3621.

122 Wadiche JI, Amara SG, Kavanaugh MP (1995). Ion fluxes associated with excitatory amino acid transport. **Neuron**; 15:721-728.

123 Waerntges S, Friedrich B, Henke G (2002). Cerebral localization and regulation of the cell volume-sensitive serum- and glucocorticoid-dependent kinase SGK1. **Pflugers Arch**; 443:617-624.

124 Wagner CA, Friedrich B, Setiawan I, Lang F, Broer S (2000). The use of Xenopus laevis oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. **Cell Physiol Biochem**; 10:1-12.

125 Wahle S, Stoffel W (1996). Membrane topology of the high-affinity L-glutamate transporter (GLAST-1) of the central nervous system. **J Cell Biol**; 135:1867-1877.

126 Waldegger S, Barth P, Forrest JN, Jr., Greger R, Lang F (1998). Cloning of sgk serine-threonine protein kinase from shark rectal gland - a gene induced by hypertonicity and secretagogues. **Pflugers Arch**; 436:575-580.

127 Waldegger S, Barth P, Raber G, Lang F (1997). Cloning and characterization of a putative human serine/threonine protein kinase transcriptionally modified during anisotonic and isotonic alterations of cell volume. **Proc Natl Acad Sci U S A**; 94:4440-4445.

128 Waldegger S, Erdel M, Nagl UO, Barth P, Raber G, Steuer S, Utermann G, Paulmichl M, Lang F (1998). Genomic organization and chromosomal localization of the human SGK protein kinase gene. **Genomics**; 51:299-302.

129 Waldegger S, Gabrysch S, Barth P, Fillon S, Lang F (2000). h-sgk serine-threonine protein kinase as transcriptional target of p38/MAP kinase pathway in HepG2 human hepatoma cells. **Cell Physiol Biochem**; 10:203-208.

130 Wang J, Barbry P, Maiyar AC, Rozansky DJ, Bhargava A, Leong M, Firestone GL, Pearce D (2001). SGK integrates insulin and mineralocorticoid regulation of epithelial sodium transport. **Am J Physiol Renal Physiol**; 280:F303-F313.

131 Wang Z, Pekarskaya O, Bencheikh M, Chao W, Gelbard HA, Ghorpade A, Rothstein JD, Volsky DJ (2003). Reduced expression of glutamate transporter EAAT2 and impaired glutamate transport in human primary astrocytes exposed to HIV-1 or gp120. **Virology**; 312:60-73.

132 Warntges S, Friedrich B, Henke G, Duranton C, Lang PA, Waldegger S, Meyermann R, Kuhl D, Speckmann EJ, Obermuller N, Witzgall R, Mack AF, Wagner HJ, Wagner A, Broer S, Lang F (2002). Cerebral localization and regulation of the cell volume-sensitive serum- and glucocorticoid-dependent kinase SGK1. **Pflugers Arch**; 443:617-624.

133 Watkins JC, Evans RH (1981). **Annu Rev, Pharmacol Toxicol 21**165-204.

134 Webster MK, Goya L, Ge Y, Maiyar AC, Firestone GL (1993). Characterization of sgk, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum. **Mol Cell Biol**; 13:2031-2040.

135 Weinman EJ, Steplock D, Wang Y, Shenolikar S (1995). Characterization of a protein cofactor that mediates protein kinase A regulation of the renal brush border membrane Na(+)-H+ exchanger. **J Clin Invest**; 95:2143-2149.

136 Wulff P, Vallon V, Huang DY, Volkl H, Yu F, Richter K, Jansen M, Schlunz M, Klingel K, Loffing J, Kauselmann G, Bosl MR, Lang F, Kuhl D (2002). Impaired renal Na(+) retention in the sgk1-knockout mouse. **J Clin Invest**; 110:1263-1268.

137 Yun CC (2003). Concerted roles of SGK1 and the Na+/H+ exchanger regulatory factor 2 (NHERF2) in regulation of NHE3. **Cell Physiol Biochem**; 13:29-40.

138 Yun CC, Chen Y, Lang F (2002). Glucocorticoid activation of Na(+)/H(+) exchanger isoform 3 revisited. The roles of SGK1 and NHERF2. **J Biol Chem**; 277:7676-7683.

139 Yun CC, Palmada M, Embark HM, Fedorenko O, Feng Y, Henke G, Setiawan I, Boehmer C, Weinman EJ, Sandrasagra S, Korbmacher C, Cohen P, Pearce D, Lang F (2002). The serum and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 and the Na+/H+ exchange regulating factor NHERF2 synergize to stimulate the renal outer medullary K+ channel ROMK1. **J Am Soc Nephrol**; 13:2823-2830.

140 Zecevic M, Heitzmann D, Pearce D, Verssey F (2002). Both apical (ENaC) and basolateral (Na,K ATPase) Na+ Transport Proteins are upregulated by SGK in vitro systems. **Pflugers Arch**283.

7. Anhang

7.1 Danksagung

Während meiner gesamten Arbeit umgaben mich viele Menschen, die mich auf unterschiedliche Weise unterstützt, motiviert und befähigt haben. Jeder einzelne hat damit zum Erfolg meines Schaffens beigetragen.
Deshalb möchte ich heute und an dieser Stelle vor alles andere ein großes Danke stellen. Es ist mir ein Anliegen, stellvertretend hierfür nur einige herauszugreifen und zu nennen:

Zuerst fühle ich mich in tiefem Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Florian Lang verbunden. Die Überlassung dieses überaus interessanten Themas, die enorme Unterstützung, derer ich jederzeit und auf allen Gebieten gewiss sein durfte, seine menschliche Größe und seine berufliche Begeisterung ließen diese Arbeit erst entstehen.
Ein herzliches Dankeschön an meinen Betreuer und Laborleiter Dr. rer. nat. Christoph Böhmer für seine kompetente technische Unterstützung im Labor, für seine Hilfsbereitschaft, seine Freundlich- und Menschlichkeit, seine Mühe, mit der er mir die elektrophysiologischen Grundlagen und die Laborarbeit zugänglich machte.
Diesen Dank richte ich ebenso an Frau Birgitta Noll, die mich bei den molekularbiologischen Arbeiten engagiert unterstützt hat und mit ihrer humorvollen und hilfsbereiten Art zu einer sehr guten Laboratmosphäre beigetragen hat.
Für hervorragende Unterstützung in der Immunhistochemie danke ich Herrn PD Dr. rer. nat. Konrad Kohler der Augenklinik Tübingen.
Besonderer Dank gilt auch dem gesamten Team des Oozytenlabors für die uneingeschränkte Unterstützung in Form von fachlichen Diskussionen und Auseinandersetzungen mit Problemen, weiterbringenden Gespräche auch

außerhalb des Themas, für die viele Zeit und Stunden gemeinsamen Schaffens und die entgegengebrachte Sympathie, aus der einige gute Freundschaften entstanden und gewachsen sind.
Herrn Uwe Schüler, Peter Dürr und Jürgen Kahlke gilt mein Dank für die technische Unterstützung und Umsetzung bei Problemstellungen.
Bei Frau Dr. rer. nat. Monica Palmada bedanke ich mich sehr für die konstruktiven Gespräche und die Einführung in die Molekularbiologie der EAAT.
Herr Dr. rer. nat. Horst Apfel und Frau Tanja Loch waren für mich eine große Hilfe in organisatorischen Angelegenheiten. Ich danke ihnen recht herzlich.
Schließlich danke ich sehr meiner Familie, Freunden und Bekannten, die mich auf jeder Strecke meines Weges unterstützten, Misserfolge und Erfolgserlebnisse mit mir teilten, mir in jeder Situation die Zuwendung und Hilfestellung zuteil werden ließ, die für die Entstehung dieser Arbeit für mich notwendig war.

Vielen Dank.

7.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

28.02.1979	geboren in Göppingen
	Familienstand ledig
	Eltern: Jürgen Schniepp,
	Christa Schniepp (geb. Wiest)

Schulbildung

1985-1989	Grundschule in Rechberghausen
1989-1998	Freihof-Gymnasium in Göppingen
Juni 1998	Allgemeine Hochschulreife

Wehr-/Ersatzdienst

01.09.98 bis 30.09.99	Zivildienst in der Klinik am Eichert in Göppingen davon 3 Monate im OP-Bereich; 9 Monate auf einer Pflegestation

Studium

Seit April 2000	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen
13.03.2002	Ärztliche Vorprüfung in Wurmlingen
25.03.2003	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung in Reutlingen
30.03.2005	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung in Tübingen
10.11.2006	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung in Stuttgart

August 2002	Arbeit am Physiologischen Institut I unter Anleitung
bis September 2004	von Professor Dr. med. Florian Lang
	Promotion mit vorliegender Arbeit