

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

**Regulation von endogener Na⁺/K⁺-ATPase und
exogen exprimierten K⁺-Kanälen in *Xenopus*
Oozyten durch die Serum- und Glucocorticoid-
abhängige Kinase SGK**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Guido Henke
aus Schleswig**

2004

Dekan: Prof. Dr. Claus D. Claussen
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Florian Lang
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Hartmut Oßwald

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung	5
1.1	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase und K ⁺ -Leitfähigkeit als Grundlage der Zellfunktion	6
1.1.1	Die Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	10
1.1.2	Der Renal Outer Medullary K ⁺ -channel ROMK	12
1.1.3	Der spannungsgesteuerte K ⁺ -Kanal K _v 1.3	14
1.1.4	Na ⁺ -Resorption in der Niere	16
1.2	Funktion der Serum- und Glucocorticoid-abhängigen Kinase SGK	19
1.2.1	Eingruppierung, Isoformen, Gewebeverteilung	19
1.2.2	Regulation	20
1.2.3	Interaktion mit anderen Proteinen	21
1.2.4	Physiologische Funktion	22
1.3	Oozyten von <i>Xenopus laevis</i> als Expressionssystem	24
1.4	Fragestellung der Arbeit	27
2	Methoden	28
2.1	Lösungen/Substanzen	28
2.2	Oozytenpräparation	29
2.3	cRNA-Synthese/Injektion	30
2.4	Elektrophysiologische Methoden	32
2.4.1	Potentialmessung (current clamp)	32
2.4.2	Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp (TEVC)	33
2.4.3	Messung des Pumpstromes der Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	34
2.4.4	Ionenselektive Elektroden	36
2.5	Durchführung der Experimente	37
2.6	Auswertung und Statistik	38
2.7	Fehlerdiskussion	39
2.7.1	Oozytenpräparation	39
2.7.2	Lösungen und Geräte	40
2.7.3	Auswertung	40

3	Versuche und Ergebnisse	41
3.1	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	41
3.1.1	5 Stunden K ⁺ -freie Inkubation	41
3.1.2	Na ⁺ _i -Konzentration und pH _i in SGK-injizierten Oozyten	44
3.1.3	10 min K ⁺ -freie Inkubation	46
3.1.4	Isoformen der Serum- und Glucocorticoid-abhängigen Kinase	52
3.1.5	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	54
3.2	ROMK1	55
3.2.1	Koexpression von ROMK1, SGK1 und NHERF2	55
3.2.2	Strom-Spannungs-Diagramm und Gating des ROMK	58
3.2.3	Zusammenfassung der Ergebnisse zum ROMK1	60
3.3	K _v 1.3	61
3.3.1	Regulation durch die permanent aktive ^{S422D} SGK1	61
3.3.2	Aktivierung des K _v 1.3 durch die Isoformen der SGK	63
3.3.3	Stabilisierung des K _v 1.3 in der Membran durch SGK	65
3.3.4	Koexpression von Nedd4-2 mit K _v 1.3 und SGK	68
3.3.5	Stimulation anderer spannungsabhängiger K ⁺ -Kanäle	75
3.3.6	Zusammenfassung der Ergebnisse zum K _v 1.3	76
4	Diskussion	77
4.1	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	77
4.2	ROMK1	84
4.3	K _v 1.3	86
5	Zusammenfassung	92
6	Literaturverzeichnis	93
7	Anhang	115
7.1	Danksagung	115
7.2	Lebenslauf	116

1 Einleitung

Zur Erfüllung der vielfältigen zellulären Funktionen sind Zellen von einer hydrophoben Phospholipiddoppelschicht umgeben, die Intra- und Extrazellulärraum als zwei wässrige Milieus mit unterschiedlicher Zusammensetzung voneinander trennt. Größere nicht lipidlösliche Moleküle und geladene Teilchen können diese sogenannte Plasmamembran nur durch eingelagerte transmembranöse Proteine überwinden, die als spezifische Kanäle und Transporter wirken.

Zur Anpassung an wechselnde äußere Bedingungen und Anforderungen an die Zellen, z.B. unterschiedliche Osmolarität, Proliferation, Stofftransport und Signaltransduktion, unterliegen die Membranproteine in ihrer Funktion als „Kontaktstellen“ mit der „Umwelt“ einer starken Regulation. Diese Regulation kann einerseits durch direkte Veränderung der Eigenschaften der Kanäle und Transporter geschehen, andererseits durch Veränderung der Kanal- oder Transporterdichte in der Zellmembran [4]. Nicht funktionierende Membranproteine oder ihre fehlerhafte Regulation können dabei direkte Ursachen für Erkrankungen sein, z.B. Little-Syndrom, Mucoviszidose, Long QT-Syndrom oder Epilepsien [12].

Durch vielfältige Netzwerke von Signalwegen in der Zelle werden die extrazellulären Stimuli vermittelt. Eine Schlüsselposition in einem dieser Signalwege hat die Serum- und Glucocorticoid-abhängige Kinase SGK. Ihre Rolle in der Regulation der für die fundamentalen Zellfunktionen notwendigen Na⁺/K⁺-ATPase sowie der zwei K⁺-Kanäle ROMK1 (*Renal Outer Medullary K⁺-Channel 1*) und K_v1.3 (*Voltage gated K⁺-Channel 1.3*) soll in dieser Arbeit untersucht werden.

1.1 Na⁺/K⁺-ATPase und K⁺-Leitfähigkeit als Grundlage der Zellfunktion

Ionenverteilung

Intrazellulär findet sich eine große Zahl von Proteinen mit negativer Nettoladung, geringe Konzentrationen an Na⁺-Ionen und Cl⁻-Ionen, eine äußerst geringe Ca²⁺-Konzentration sowie eine hohe Konzentration an K⁺-Ionen. Extrazellulär hingegen gibt es eine vernachlässigbar kleine Konzentration großer Anionen, hohe Na⁺- und Cl⁻-Konzentrationen, eine im Vergleich zu Innen um mehrere Größenordnungen höhere Ca²⁺-Konzentration und eine niedrige K⁺-Konzentration. Bikarbonat liegt extrazellulär etwas höher konzentriert als intrazellulär vor (Tab. 1) [194].

	Intrazellulär	Extrazellulär	Quotient _{außen/innen}
Na ⁺	8-30	145	~10
K ⁺	100-155	5	~40 ⁻¹
Ca ²⁺	0,0001	2	~10 ⁴
Cl ⁻	4-30	120	variabel
HCO ₃ ⁻	8-15	25	~2,5
große Anionen	100-150	5	~40 ⁻¹

Tab. 1: Ionenkonzentration im Intra- und Extrazellulärraum (mmol/l H₂O) nach [123, 195].

Ursache für diese Ionenverteilung ist ein energieverbrauchender Transportprozess, der Na⁺-Ionen aus der Zelle und K⁺-Ionen in die Zelle befördert.

Die bereits von Jens C. Skou 1957 [202] postulierte Na⁺/K⁺-Pumpe gewinnt aus der Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) die nötige Energie, um entgegen des elektrochemischen Gradienten drei Na⁺-Ionen aus der Zelle und zwei K⁺-Ionen in die Zelle zu transportieren (Abb. 1). Wegen des Verbrauchs von ATP wird dieses transmembranöse Transportprotein auch Na⁺/K⁺-ATPase genannt. Die Bedeutung dieses Transports für die Zellfunktion wird schon allein daran deutlich, dass 30-70% der Energie einer Zelle für die Na⁺/K⁺-ATPase verbraucht wird. Dabei werden

pro Protein ca. 150-600 Na⁺/s umgesetzt [194]. Die Leitfähigkeit ist wie bei anderen Transportern <<1pS [195].

Durch die Na⁺/K⁺-ATPase ist vor allem die Aufrechterhaltung einer niedrigen intrazellulären Na⁺-Konzentration gewährleistet. Denn es kommt entlang des hohen elektrochemischen Gradienten für Na⁺ zu einem „Leckstrom“ von Na⁺ in die Zelle, obwohl die Zellmembran in Ruhe schlecht durchlässig für Na⁺ ist. Dieses und verschiedene Stoffwechsel- und Erregungsprozesse, bei denen Na⁺ in die Zelle strömt (siehe unten), würden sonst zu einer Erhöhung der intrazellulären Na⁺-Konzentration führen und die Zellfunktion beeinträchtigen [49, 95].

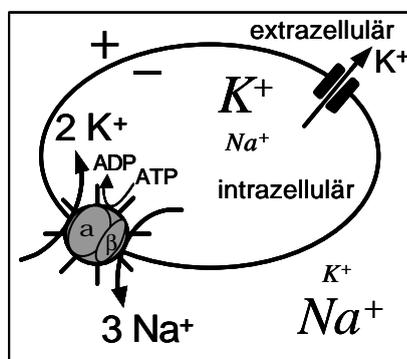


Abb. 1: Schematische Darstellung der Na⁺/K⁺-ATPase, der Ionenverteilung und des Membranpotentials durch K⁺-Kanäle.

K⁺-Leitfähigkeit und Membranpotential

Ionenkanäle sind makromolekulare Poren in der Zellmembran. Im Vergleich zu der eben beschriebenen Na⁺/K⁺-ATPase weisen sie eine viel höhere Flussrate auf (>10⁶ Ionen/s) [103, 123]. Es ist durch die Kanäle allerdings nur eine Diffusion der Ionen entlang des elektrochemischen Gradienten möglich.

Die Öffnung der Kanäle („Gating“) geschieht durch Konformationsänderungen oder Aneinanderlagerung von Bestandteilen des Kanals und kann durch unterschiedliche Mechanismen gesteuert sein. Es gibt beispielsweise ligandengesteuerte Kanäle oder durch „second messenger“ gesteuerte Kanäle, die sich nach Bindung eines Substrats öffnen. Des Weiteren existieren spannungsabhängige Kanäle, die auf Veränderungen des Membranpotentials mit Konformationsänderungen reagieren [4, 42, 103].

Eine weitere wichtige Eigenschaft von Membrankanälen ist die Selektivität für bestimmte Ionen. Man unterscheidet unselektive Kationen- und Anionenkanäle, sowie Ionenkanäle für Cl⁻, K⁺, Na⁺ und Ca²⁺. Wegen Größe und Struktur der Pore sowie Bindungsstellen für die unterschiedlichen Ionen wird eine Ionenart beim Durchtritt durch den jeweiligen Kanal bevorzugt [103]. Von den bekannten Ionenkanälen zeigt die Gruppe der für K⁺ permeablen Kanäle die größte strukturelle Variabilität.

Zellen haben in Ruhe eine hohe Leitfähigkeit für Kalium. Dies ermöglicht einen Ausstrom der geladenen K⁺-Ionen, der gleichzeitig ein elektrisches Potential über der Zellmembran erzeugt. Dadurch werden die K⁺-Ionen wiederum im intrazellulären Raum zurückgehalten. Es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen elektrischem und chemischem Gradienten ein und erzeugt das Ruhemembranpotential der Zellen. Zwischen der Na⁺/K⁺-ATPase und den K⁺-Kanälen besteht somit eine enge funktionelle Wechselwirkung (Abb. 1) [123].

K⁺-Kanäle hemmen durch ihre hyperpolarisierende Wirkung exzitatorische Einflüsse auf die Zellen und stabilisieren das Ruhemembranpotential. Außerdem kommt K⁺-Kanälen eine wichtige Rolle bei Transportprozessen in Epithelien und Gliazellen zu [103].

Da K⁺-Kanäle große Leitfähigkeiten aufweisen, sind sie elektrophysiologisch gut zu untersuchen. Viele unterschiedliche Kanäle sind bereits kloniert und können heterolog in Oozyten exprimiert werden (s. Kap. 1.3).

Homöostase

Durch die Ionenverteilung und die hohe basale Kaliumleitfähigkeit entsteht ein intrazellulär negatives Ruhemembranpotential (je nach Zelltyp -30 mV bis -90 mV). Dieses bewirkt den Ausstrom von Cl⁻-Ionen. Damit trägt es zum osmotischen Ausgleich des proteinreichen Intrazellulärtraumes gegenüber dem proteinärmeren Extrazellulärtraum bei. Auf diese Weise spielen Ionenverteilung und Membranpotential eine Rolle bei der Zellvolumenregulation [201].

Bei der Regulation der niedrigen intrazellulären Ca²⁺-Konzentration ist wiederum das niedrige intrazelluläre Na⁺ von Bedeutung. Neben einer Ca²⁺-ATPase, die Calcium direkt unter ATP-Verbrauch aus der Zelle pumpt, gibt es ein transmembranöses Transportprotein, das ein Ca²⁺-Ion im Austausch gegen

drei Na⁺-Ionen aus der Zelle befördert. Es wird also der hohe nach innen gerichtete elektrochemische Gradient für Na⁺ zum Auswärtstransport von Ca²⁺ ausgenutzt. Änderungen der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration sind ein wichtiges Regulativ vielfältiger Zellfunktionen (z.B. Funktion als second messenger; kardiale Inotropie) [123].

Auch zur Einhaltung des intrazellulären pH-Wertes gibt es ein ähnliches Antiport-System, das H⁺ im Austausch mit Na⁺ aus der Zelle transportiert und so eine Azidifizierung der Zelle verhindert [194].

Zelluläre Transportvorgänge/Erregbarkeit

Neben den eben erwähnten H⁺- und Ca²⁺-Antiportsystemen wird der mit Hilfe der Na⁺/K⁺-ATPase aufgebaute nach intrazellulär gerichtete elektrochemische Gradient für Na⁺ auch zur Resorption von größeren und polaren Molekülen genutzt. In Darm und Niere beispielsweise wird das zu resorbierende Substrat zusammen mit einem oder mehreren Na⁺-Ionen auf der luminalen Seite als Kotransport (Abb. 2) aufgenommen [194]. Die Na⁺/K⁺-ATPase befindet sich auf der basolateralen Seite der Epithelzelle und führt so gleichzeitig zur Resorption von Na⁺.

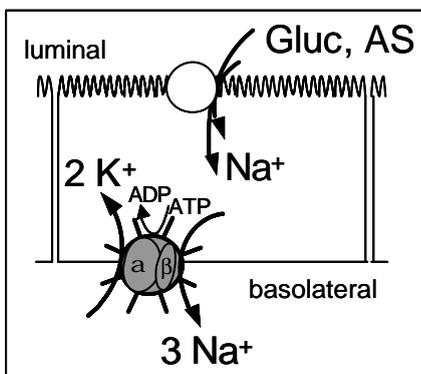


Abb. 2: Resorption von Glucose (Gluc) und Aminosäuren (AS) durch luminalen Na⁺-Kotransport und basolaterale Na⁺/K⁺-ATPase.

Die durch Ionenverteilung und K⁺-Leitfähigkeit in Ruhe entstehende Potentialdifferenz zwischen Intra- und Extrazellulärraum ist außerdem Voraussetzung für die Möglichkeit einer plötzlichen „Erregung“ von Nerven- und Muskelzellen. Durch kurzzeitige Öffnung von spannungsabhängigen Na⁺-Kanälen kommt es aufgrund des großen nach innen gerichteten elektrochemischen Gradienten für Na⁺ zu kurzfristiger Umpolung der Membran,

dem sogenannten Aktionspotential (1-2 ms in Nerv- und Skelettmuskelzellen; bis zu 400 ms in Herzmuskelzellen). Diese Umpolung führt an benachbarten Membranabschnitten wiederum zu Aktivierung von Na⁺-Kanälen, wodurch eine Fortleitung der Erregung ermöglicht wird [194].

1.1.1 Die Na⁺/K⁺-ATPase

Struktur

Die Na⁺/K⁺-ATPase befindet sich in der Plasmamembran aller tierischen Zellen. Abb. 3 zeigt ein elektronenmikroskopisches Bild einer gefriergeätzten Membran [150].

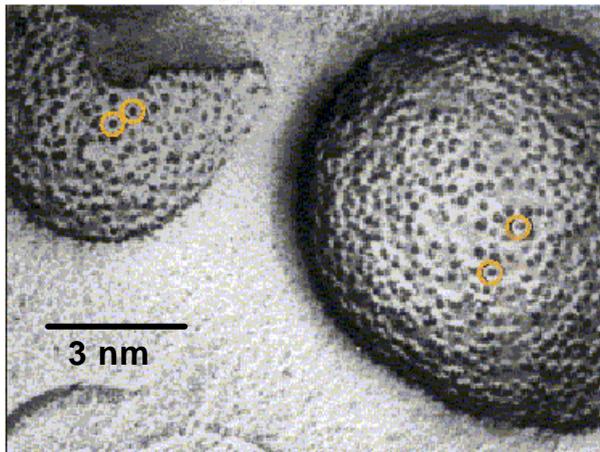


Abb. 3: Gefriergeätzte Membranvesikel bei 54000 facher Vergrößerung. Na⁺/K⁺-ATPasen sind als Korpuskel sichtbar [123].

Die Na⁺/K⁺-ATPase ist ein Proteinkomplex aus mindestens 2 Untereinheiten und gehört zu den ATPasen vom P-Typ [85]. Die α -Untereinheit (ca. 100kDa) besteht aus zehn transmembranösen Domänen und die C- und N-Enden liegen intrazellulär [55]. Die α -Untereinheit hat die Bindungsstellen für Na⁺ und K⁺ sowie ATP, so dass ihr die katalytische Funktion zugeordnet werden kann (Abb. 4) [123].

Die β -Untereinheit (45-50 kDa) besteht aus nur einer transmembranösen Domäne und ist, obwohl sie zur ATP-Spaltung nicht vorhanden sein muss, zur vollständigen Pumpfunktion notwendig. Sie scheint für die Reifung und den Transport zur Zellmembran verantwortlich zu sein (Abb. 4) [89, 90, 101, 153].

Fakultativ kann gewebeabhängig eine γ -Untereinheit funktionell exprimiert sein [15, 121]. Sie hat ein Molekulargewicht von ca. 6,5 kDa und enthält eine transmembranöse Domäne, das N-Ende liegt außen und das C-Ende innen [218]. Eine eindeutige Funktion konnte dieser Untereinheit noch nicht zugeordnet werden. Die γ -Untereinheit gehört zu einer Familie von Proteinen, die in der Lage sind, in *Xenopus* Oozyten eine zusätzliche K⁺-Leitfähigkeit zu erzeugen. Hierzu zählen außer der γ -Untereinheit auch PLM, CHIF und Mat-8 [157].

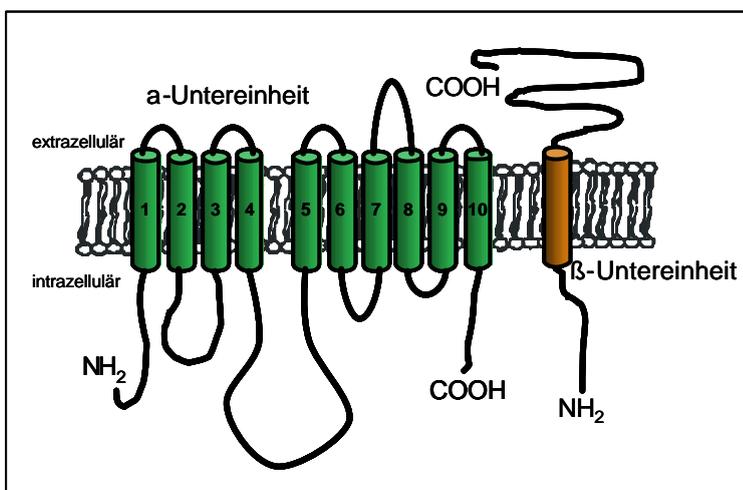


Abb. 4: Struktur der Na⁺/K⁺-ATPase nach [28].

Reaktionsschema

Im Reaktionsschema der Na⁺/K⁺-ATPase unterscheidet man zwei Konformationen, die E₁- und die E₂-Form. Zunächst wird in der E₁-Form ATP gebunden, wodurch eine energiereiche Phosphatbindung entsteht und intrazellulär drei Na⁺-Bindungsstellen freigegeben werden. Diese haben eine hohe Affinität, so dass in der Zelle niedrige Na⁺-Konzentrationen erreicht werden können (5-10 mM). Daraufhin ändert sich die Konformation des Enzyms und die Na⁺-Ionen gelangen auf die Außenseite der Membran. In dieser jetzt E₂-Form genannten Konformation hat die Phosphatbindung ihre Energie verloren, und es werden extrazellulär zwei K⁺-Bindungsstellen frei. Nachdem K⁺ gebunden hat, kommt es unter Phosphatabspaltung wieder zu einer Konformationsänderung, die K⁺ nach intrazellulär bringt. Hier kann nach

Abgabe des K⁺-Ions wieder ATP gebunden werden [123, 195]. Da ein solcher Transportzyklus die Translokation einer positiven Ladung nach außen bewirkt, erzeugt die Pumpe einen auswärts gerichteten Strom. Man nennt sie daher elektrogen. Ein oben beschriebener kompletter Durchlauf der Pumpe dauert 10⁻² s [103].

Die α -Untereinheit beeinflusst die Affinität der Na⁺/K⁺-ATPase für K⁺ in einer komplexen Na⁺- und spannungsabhängigen Art und Weise. Dabei verschiebt sie das Gleichgewicht in Richtung E₁-Konformation [15, 219].

In unmittelbarer Nachbarschaft zur K⁺-Bindungsstelle liegt eine Bindungsstelle für Ouabain (g-Strophanthin, Digitalisglykosid), das ein hochselektiver Blocker der Na⁺/K⁺-ATPase ist und die Pumpe am Übergang von E₂ zu E₁ anhält. Die Affinität zu diesem Blocker ist spezieabhängig über einen weiten Bereich unterschiedlich. So hat beispielsweise die Na⁺/K⁺-ATPase der Ratte eine 10³-10⁴ fach niedrigere Empfindlichkeit als die des Menschen. TEA⁺ ist eine weitere Substanz, die eine Blockade der Pumpaktivität bewirkt [70].

1.1.2 Der Renal Outer Medullary K⁺-channel ROMK

Struktur

Der ROMK gehört in die Gruppe der einwärts-gleichrichtenden K⁺-Kanäle (K_{ir}) und wird nach neuer Nomenklatur auch K_{ir}1.1 genannt. Er wurde 1993 aus der Ratteniere kloniert [104] und besteht aus vier α -Untereinheiten, die jeweils zwei Transmembran-Segmente haben (M1 und M2), zwischen denen die porenbildende H-Region liegt (Abb. 5). Die 4 α -Untereinheiten sind über den C-Terminus miteinander verbunden [12]. Anlagerung von β -Untereinheiten wie Sulfonylharnstoff-Rezeptoren (SUR1 und SUR2) und CFTR ist beschrieben und für die Regulation von Bedeutung (grau in kleinem Schema, Abb. 5) [12, 160].

Einwärtsgleichrichtung bedeutet, dass der Strom von K⁺ nach innen besser geleitet wird als der Strom von K⁺ nach außen. Dieses wird beim ROMK durch einen spannungsabhängigen Block des Auswärtsstromes durch intrazelluläres Mg²⁺ erreicht [148].

Als ATP-regulierter Kanal besitzt der ROMK intrazellulär am C-Terminus eine ATP-Bindungsstelle [24-26]. Inzwischen sind beim Menschen mindestens fünf Isoformen (ROMK1-5) bekannt [173]. ROMK ist durch Ba²⁺ hemmbar; im Gegensatz zu anderen K⁺-Kanälen allerdings nicht durch TEA⁺ [104].

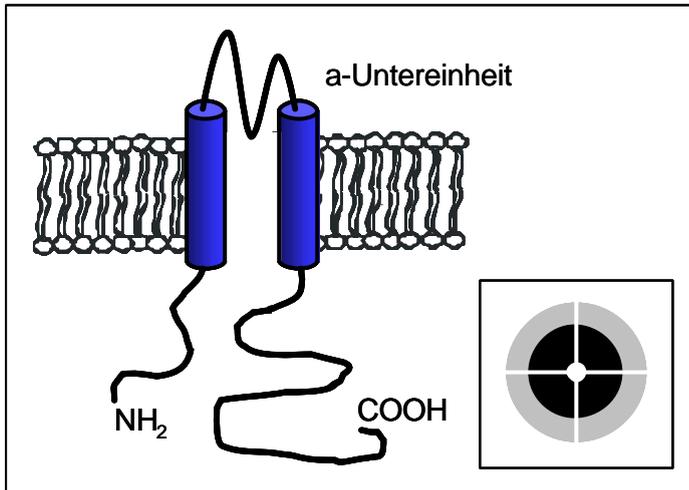


Abb. 5: Struktur des ROMK nach [12].

Expression

ROMK1 ist im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife und im kortikalen Sammelrohr exprimiert [108, 191, 200], ROMK3 im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife und im distalen Konvolut, ROMK2 im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife bis zum kortikalen Sammelrohr [32, 91, 129]. RNA für ROMK findet sich auch in Mikroglia (ROMK4, ROMK5), hier gibt es aber keine Hinweise auf Expression des Proteins [193].

Funktion

Allgemein spielen die einwärts-gleichrichtenden K⁺-Kanäle eine wichtige Rolle bei der Erhaltung des Ruhemembranpotentials nahe dem Umkehrpotential für K⁺ sowie bei der Kontrolle der K⁺-Sekretion und -Homöostase [187].

Dabei sind die Kanäle mit starker Einwärtsgleichrichtung vorwiegend bei Regulation der Erregbarkeit von Zellen beteiligt, da sie eine schärfere Reizschwelle für die Erregung bewirken. Kanäle mit weniger starker Einwärtsgleichrichtung ermöglichen einen besseren K⁺-Auswärtsstrom und sind deshalb in Epithelien zu finden, die K⁺ sezernieren [12].

In der Niere repräsentiert der ROMK den K⁺-Kanal mit kleiner Leitfähigkeit in der apikalen Membran von Sammelrohr und aufsteigendem Teil der Henle-Schleife. Damit ist er für die Ausscheidung von K⁺ über den Urin von herausragender Bedeutung [160]. Funktionseinschränkende Mutationen des ROMK im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife führen zum Bartter-Syndrom Typ II mit hypokaliämischer Alkalose. Die verminderte K⁺-Sekretion luminal hemmt den Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Kotransport im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife und führt zu Salzverlust und sekundärem Hyperaldosteronismus. Dieses wiederum verursacht vermehrte Na⁺-Resorption und K⁺-Sekretion in den Hauptzellen des Sammelrohres, sowie eine verstärkte H⁺-Ionen Sekretion in den benachbarten Zwischenzellen [12, 23, 24, 129].

1.1.3 Der spannungsgesteuerte K⁺-Kanal K_v 1.3

Struktur

Spannungsabhängige K⁺-Kanäle bestehen gleich anderen spannungsabhängigen Kanälen für Na⁺ und Ca²⁺ aus 4 α -Untereinheiten, die ihrerseits aus 6 transmembranösen Segmenten (S1-S6) aufgebaut sind [145, 216]. Zwischen den Segmenten S5 und S6 befindet sich eine ionenselektive sogenannte P-Region und die Pore entsteht durch Aneinanderlagerung der α -Untereinheiten in diesem Bereich. Das Segment S4 dient als Spannungssensor (Abb. 6) [4, 12].

K_v1.3 gehört zur *Shaker*-Überfamilie, die aus vier Familien (K_v1 - K_v4) besteht, wobei es wiederum 9 Unterfamilien von K_v1 gibt (K_v1.1 - K_v1.9) gibt. Innerhalb dieser Unterfamilien ist die Ähnlichkeit auf Ebene der Aminosäuren mit 70% sehr hoch [12]. Der K_v-Kanal kann sowohl aus vier gleichen α -Untereinheiten bestehen (Homo-Oligomer) oder aus unterschiedlichen α -Untereinheiten (Hetero-Oligomer). Dieses führt zu einer Vielzahl von Kanälen mit unterschiedlichen Eigenschaften (kleines Schema, Abb. 6) [12].

Spannungsabhängige Aktivierung des K_v1.3 ist von schneller Inaktivierung gefolgt. Die Inaktivierung dieser sogenannten N-Typ-Ströme wird durch einen „Ball“ am intrazellulären N-Terminus erzeugt, der die Pore von innen nach erfolgter Aktivierung wieder verschließt [216]. Außerdem gibt es nur eine

langsame Erholung von der Inaktivierung, so dass nach kurzfristig wiederholter Depolarisierung die K_v1.3-Ströme kleiner werden [105].

Häufig ist jede α-Untereinheit mit einer β-Untereinheit assoziiert, die Einbau und Öffnung des Kanals verändern kann [126, 151, 216]. Die β-Untereinheiten durchbrechen die Plasmamembran vermutlich nicht, sondern liegen intrazellulär (Abb. 6) [12].

Expression

K_v1.3 ist exprimiert im Gehirn [127, 225, 239], in Lymphozyten [137, 152, 174], in der Niere [251] [196], in glatten Muskelzellen von Gefäßen [54] und in der Blase [58]. Weiterhin wurde K_v1.3 im Kaninchenherz [146], in Ganglienzellen der Retina [182] und ein Kanal mit >90% Ähnlichkeit zu K_v1.3 im Hoden von Ratten gefunden [113]. Neuere Untersuchungen zeigen auch eine starke Expression von K_v1.3 in Zellen von Prostata- und Kolonkarzinomen [1, 2].

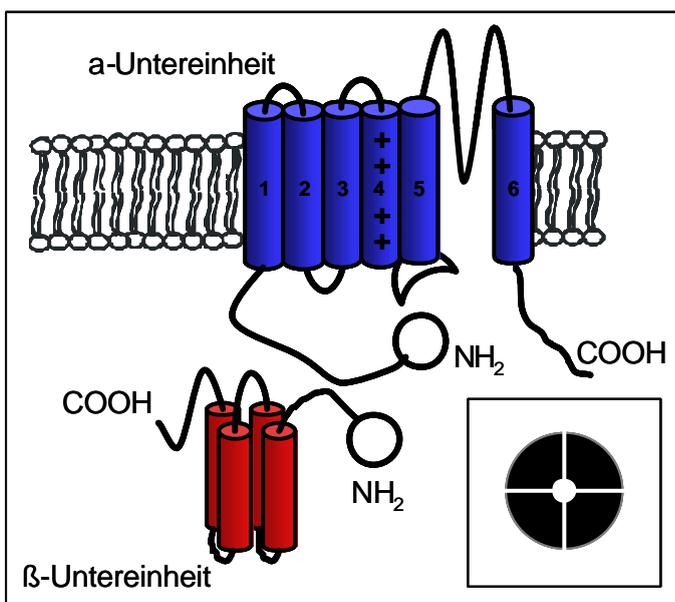


Abb. 6: Struktur des K_v1.3 nach [12].

Funktion

In Lymphozyten wird K_v1.3 vermehrt exprimiert, wenn diese aktiviert werden und proliferieren [40, 137, 152]. Dadurch ist K_v1.3 ein interessanter Ansatzpunkt für Immunsuppression über eine Blockade des Kanals [39]. CD95 induzierte Apoptose hingegen geht mit verminderter Expression von K_v1.3 einher [97].

Die Bedeutung des K_v1.3 für proliferierende Zellen wird auch daran deutlich, dass der Kanal bei einigen Neoplasien vermehrt exprimiert ist [1, 2].

Im Gehirn haben Mikroglia-Zellen eine wichtige Funktion bei der Phagozytose kranker Zellen. Die Aktivierung von Mikroglia führt zur Hochregulation von K_v1.3. [48, 120]. Da überaktivierte Mikroglia als Ursache für neurodegenerative Erkrankungen diskutiert wird, könnte auch hier die Stimulation von K_v1.3 eine Rolle spielen und somit auch ein therapeutischer Ansatzpunkt werden [193].

Weiterhin spielen K_v-Kanäle eine wichtige Rolle in der Übertragung von elektrischen Signalen in erregbaren Zellen und in glatten Muskelzellen, wo sie den basalen Muskeltonus erhalten und einer Vasokonstriktion entgegenwirken [126]. In Nervenzellen führen sie zu rascherer Repolarisation. Beispielsweise konnten Hippocampus-Zellen, die mit K_v1.3 transfiziert waren, nach hochfrequenter Stimulation eine deutlich höhere Aktionspotentialfrequenz weiterleiten als nicht transfizierte Kontrollzellen, bevor es zum Block durch Depolarisation kam [130].

In der Niere, so wird von Yao et al (1996) postuliert, spielt K_v1.3 eine Rolle bei K⁺-Mangel, indem er in der basolateralen Membran des kortikalen Sammelrohres exprimiert wird und die K⁺-Resorption fördert [251].

1.1.4 Na⁺-Resorption in der Niere

Die Regulation der beschriebenen Membranproteine kann sehr gut am Beispiel der Na⁺-Resorption in der Niere deutlich gemacht werden. Na⁺ ist im Körper das Kation mit der höchsten extrazellulären Konzentration. Das intravasale Volumen des Körpers wird zum größten Teil über Retention und Ausscheidung von Na⁺ in der Niere gesteuert. Ein Zusammenhang zwischen hoher Natriumzufuhr und Hypertonie ist bekannt [123].

Der Natriumbestand des Körpers beträgt durchschnittlich 4 Mol, davon befinden sich 40% im Knochen, der verbleibende Anteil ist vorwiegend im Plasma und Interstitium frei verfügbar. Die Aufnahme von Na⁺ ist individuell sehr unterschiedlich und schwankt zwischen wenigen mmol und 1000 mmol pro Tag (1mmol entspricht 58 mg NaCl).

Filtration und Resorption

In den Glomeruli der Nephrone werden die Na⁺-Ionen frei filtriert, so dass in den ca. 180 l isotonen Primärharn pro Tag ca. 1,5 kg NaCl gelangen. Davon werden ca. 99% im Verlauf des anschließenden Tubulus-Systems resorbiert.

In den proximalen Tubulusabschnitten wird der größte Anteil des filtrierten Na⁺ resorbiert. Im Kotransport mit Glucose, Aminosäuren und anderen für den Körper wichtigen Stoffen und im Austausch gegen H⁺-Ionen durch den Na⁺-H⁺-Austauscher wird Na⁺ durch die apikale Membran aufgenommen und basolateral durch die Na⁺/K⁺-ATPase ins Blut abgegeben. H⁺ reagiert im Tubuluslumen mit Bikarbonat zu CO₂, welches wieder durch die apikale Membran diffundiert. In der Zelle entsteht wieder Bikarbonat, das zusammen mit Na⁺ durch einen basolateral lokalisierten Na⁺-HCO₃⁻-Kotransport ins Blut resorbiert wird [194]. Na⁺ wird auch parazellulär resorbiert. Wasser folgt osmotisch zum Teil parazellulär aber hauptsächlich transzellulär durch apikale und basolaterale Aquaporine [223].

Im distalen Tubulus und Sammelrohr erfolgt dann die Feineinstellung der Na⁺-Ausscheidung. Die Regulationsbreite beträgt ca. 10% des gesamten filtrierten und rückresorbierten Na⁺. Vorherrschend ist hier ein transzellulärer Transport durch luminale epitheliale Natriumkanäle (ENaC), der wiederum durch den elektrochemischen Gradienten für Na⁺ ermöglicht wird. Im Austausch für Natrium wird Kalium nach luminal abgegeben, so dass ein enger Zusammenhang zwischen Natrium- und Kaliumhaushalt besteht [92, 194].

Regulation der Na⁺-Resorption und K⁺-Ausscheidung

Wichtigstes Hormon zur Regulation der Na⁺- und K⁺-Ausscheidung im distalen Tubulus ist Aldosteron [168]. Je nach Bedarf werden unter Aldosteron luminal epitheliale Na⁺-Kanäle (ENaC) in die Zellmembran gebaut, so dass eine entsprechende Menge Na⁺ entlang seines elektrochemischen Gradienten in die Zelle gelangt und dem Urin entzogen wird [13]. Auch ein stimulierender Effekt auf die basolaterale Na⁺/K⁺-ATPase durch Aldosteron ist bekannt [197]. Die K⁺-Ausscheidung in den Urin erfolgt proportional zur Na⁺-Aufnahme über luminale K⁺-Kanäle, insbesondere den oben beschriebenen ROMK1, und führt zu einer Senkung der K⁺-Konzentration im Blut [123, 173].

Über welche Signalwege der Effekt von Aldosteron intrazellulär verarbeitet wird ist Gegenstand intensiver Forschung. Es ist bekannt, dass der Einbau des ENaC in die luminale Membran als früher Effekt von Aldosteron unter Vermittlung der Serum- und Glucocorticoid-abhängigen Kinase (SGK) steht [143, 177, 227]. Eine Wirkung auf ROMK auch über die SGK war bisher nicht bekannt [177]. Als später, nach mehreren Stunden bis Tagen auftretender, natriumsparender Aldosteron-Effekt wird eine durch erhöhte Transkription ausgelöste Zunahme von Na⁺/K⁺-ATPasen in der Zelle angenommen [162].

1.2 Funktion der Serum- und Glucocorticoid-abhängigen Kinase SGK

Die Wirkung extrazellulärer Stimuli auf eine Zelle wird über intrazelluläre und membranständige Signalmechanismen weitergeleitet und resultiert aus einem komplexen Zusammenspiel von Proteinkinasen, Phospholipasen und Phosphatasen. Proteinkinasen bewirken dabei die Bindung eines Phosphatrestes aus ATP an eine Aminosäure (Serin, Threonin oder Tyrosin) des regulierten Proteins. Dies führt durch lokale Ladungsänderung zu Konformationsänderungen, Freigabe von Bindungsstellen oder Änderungen der Affinität für Substrate an diesem regulierten Protein. Dadurch werden bestimmte Prozesse aktiviert oder gehemmt [181]. Proteinphosphatasen bewirken das Gegenteil. Sie vermitteln die Abspaltung eines Phosphatrestes von dem regulierten Protein und damit wiederum die Aktivierung oder Hemmung des betroffenen Proteins [87, 181].

Die Serum- und Glucocorticoid-abhängige Kinase (SGK) wurde 1993 entdeckt. Die intrazelluläre Konzentration von mRNA dieses Proteins stieg in SGK exprimierenden Brustkrebszellen von Ratten innerhalb von 30 min stark an, nachdem die Zellen Glucocorticoiden oder Serum ausgesetzt wurden [244, 245]. Inzwischen ist eine große Zahl an weiteren stimulierenden Einflüssen bekannt, die verschiedene Reaktionskaskaden einbeziehen.

1.2.1 Eingruppierung, Isoformen, Gewebeverteilung

Die SGK gehört zu der Gruppe der „AGC“-Familie von Kinasen, zu denen auch Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase B (PKB), Proteinkinase C (PKC) und Proteinkinase G (PKG) zählen. Ihre katalytische Domäne hat eine 54%ige Übereinstimmung auf Aminosäureebene mit PKB [132]. Im Genom aller bisher untersuchten Eukaryonten findet sich die SGK mit einer hohen Homologie, was ein Hinweis auf eine wichtige physiologische Rolle ist [96, 232, 234]. Durch Sequenzvergleich sind zwei Isoformen der SGK mit 80%iger Ähnlichkeit gefunden worden, die SGK2 und SGK3 [125]. Humane SGK1 wird auf Chromosom 6, SGK2 auf Chromosom 20 und SGK3 auf Chromosom 8 kodiert [56, 234].

Bei der Gewebeverteilung zeigen sich Unterschiede der einzelnen SGK-Isoformen. SGK1 und SGK3 werden in allen menschlichen Geweben exprimiert, insbesondere auch stark im distalen Tubulus in der Niere [125, 133, 142, 233]. SGK2 hingegen ist in seiner Verteilung stärker eingeschränkt und wird in den Epithelien von Leber, Niere und Pankreas exprimiert [124].

1.2.2 Regulation

Transkription

Die vorwiegende Regulation der SGK geschieht auf transkriptionaler Ebene. Neben Glucocorticoiden [35, 244, 245] verstärken vor allem Mineralocorticoide (Aldosteron) über den Typ I-Rezeptor die Transkription [53, 161, 162, 199]. Eine Reihe weiterer Transkriptions-Stimulatoren ist bekannt: Unter ihnen sind FSH, LH, TNF- α und Thrombin sowie Hypertonizität der Umgebung und eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration [6, 53, 122, 132, 232]. An den Signalkaskaden für transkriptionale Regulation sind unter anderem SAPK2 (auch p38 genannt) [59, 158, 235], Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase [96, 175], Proteinkinase C [133] und cAMP [122] beteiligt.

Erhöhung der Transkription von SGK erfolgt auch durch Schädigungen von Neuronen [111], in fibrosierendem Gewebe [82, 128, 236] und während der Wundheilung [112]. Die Transkription von SGK ist vermindert durch Heparin [63]. Eine transkriptionale Regulation ist für die SGK3 und SGK2 nicht nachzuweisen [132].

Reversible Phosphorylierung

Darüber hinaus wird die SGK durch Phosphorylierung aktiviert. Wie bei der Proteinkinase B benötigt die Aktivierung von SGK die Phosphorylierung an zwei Stellen durch die 3-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1 (PDK1) und PDK2, welche ihrerseits von einer Phosphorylierung durch die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) abhängen [5, 27]. Bei der SGK1 sind dies die Aminosäuren Thr²⁵⁶ und Ser⁴²². Durch oxidativen Stress, IGF-1, Insulin oder FSH [185] kommt es zur Phosphorylierung von Ser⁴²². Dieser Prozess ist durch den PI3K-Blocker Wortmanin inhibierbar und daher PI3K-abhängig. Diese erste

Phosphorylierung ermöglicht eine zweite Phosphorylierung an Thr²⁵⁶ durch PDK, was die SGK letztendlich aktiviert [124, 175, 178]. Der Austausch von Ser⁴²² gegen Aspartat erzeugt eine konstitutionell aktive Mutante der SGK1 (SGK^{S422D}), welche in unseren Experimenten zunächst verwandt wurde.

Von untergeordneter Bedeutung ist eine weitere Aktivierung durch direkte Phosphorylierung der SGK an Thr³⁶⁹ über cAMP und PKA. Dieses benötigt aber zusätzlich die Möglichkeit zur Phosphorylierung an den oben beschriebenen Stellen [178].

Aktivierung über die „extracellular signal-regulated protein-kinase 5“ (ERK5), einem Mitglied der MAP Kinase-Familie, ist dagegen unabhängig von der Phosphorylierung an Thr²⁵⁶. Diese Signalkaskade könnte einen weiteren Aktivierungsweg durch Wachstumsfaktoren darstellen [102].

1.2.3 Interaktion mit anderen Proteinen

Die Wirkung der SGK auf ein Membranprotein ist zum Teil von weiteren Proteinen vermittelt oder abhängig [176]. Im Zusammenhang mit dieser Arbeit sind zwei dieser Proteine wichtig, nämlich Nedd4-2 und NHERF.

Nedd4-2

Die Ubiquitinligase Nedd4-2 (*Neural precursor cell expressed, developmentally downregulated*) ist in der Zelle beim Abbau von Proteinen beteiligt. Durch Ubiquitinierung, d.h. Binden von Ubiquitin, werden Proteine im Zytoplasma oder der Zellmembran markiert, damit sie dann gezielt abgebaut werden können [4, 180]. Die Ubiquitinligase Nedd4-2 vermittelt die Bindung zwischen dem jeweiligen Protein und Ubiquitin. Dafür bindet sie an das abzubauenende Protein über eine spezifische Bindungsstelle, die eine bestimmte Prolin-reiche Aminosäuresequenz aufweist. Zunächst war als Bindungsstelle nur das sogenannte PY-Motiv bestehend aus Pro-Pro-Xxx-Tyr bekannt (Xxx steht dabei für eine beliebige Aminosäure) [9]. Inzwischen ist bekannt, dass Nedd4-2 auch bei Proteinen mit anderer Sequenz (Pro-Xxx-Pro-Pro-Tyr; Pro-Pro-Leu-Pro; pS/pT) die Bindung von Ubiquitin vermitteln kann [116, 119].

Von dem epithelialen Na⁺-Kanal ENaC ist bekannt, dass er ein PY-Motiv besitzt und unter Mitwirken von Nedd4-2 durch Ubiquitinierung herunterreguliert wird [207, 208]. Diese Hemmung des Kanals wird in Oozyten durch Koexpression von SGK aufgehoben. Es konnte gezeigt werden, dass die SGK das Nedd4-2 Protein am Serin in Position 444 phosphoryliert und damit inaktiviert [62]. Die SGK bindet dabei an Nedd4-2 über das PY-Motiv in der Aminosäuresequenz der SGK. Zusammengenommen resultiert daraus die Aktivierung von ENaC durch die SGK.

NHERF

NHERF (*Natrium-Hydrogen-Exchanger Regulating Factor*) wurde als ein Protein entdeckt, das die Phosphorylierung und Regulation des Na⁺/H⁺-Austauschers durch PKA vermittelte [258]. Eine Aufgabe von NHERF besteht demnach darin, eine Verbindung und Abgrenzung von verschiedenen Signalmolekülen an der Zellmembran zu bilden [254]. Eine weitere Aufgabe ist die Regulation des Ein- und Ausbaus von Membranproteinen in die apikale Zellmembran bipolarer Zellen [254]. Es konnte gezeigt werden, dass die nicht Transkriptions-abhängige Stimulation des NHE3 durch Glucocorticoide zum einen die Isoform 2 des NHERF benötigt und zum anderen von der SGK vermittelt wird. Die Interaktion zwischen NHERF2 und SGK findet zwischen der 2 PDZ-Domäne von NHERF2 und dem C-Terminus der SGK statt [255]. Dadurch, dass NHERF2 auch an den NHE3 bindet, scheint er wichtig zu sein, um SGK an NHE3 zu verankern. So kann SGK den NHE3 sowohl durch direkte Phosphorylierung als auch durch vermehrten Einbau in die Plasmamembran stimulieren [254].

1.2.4 Physiologische Funktion

Allgemein phosphoryliert die SGK, wie auch PKB, die Aminosäuren Serin und Threonin, wenn sie in einer Arg-Xxx-Arg-Xxx-Xxx-Ser/Thr Sequenz innerhalb des Proteins vorliegen [124, 125]. Hierbei sind offensichtlich Überlappungen mit PKB möglich. Allerdings weisen nicht alle Membranproteine, die durch die SGK reguliert werden, diese Domäne auf.

Als eine wichtige Rolle der SGK wurde die Vermittlung der Aldosteron-Wirkung auf den epithelialen Na⁺-Kanal und die damit verbundene Natriumretention erkannt [7, 43, 161, 237].

Weiterhin gibt es einen Zusammenhang zwischen der SGK und der bronchialen Cl⁻-Sekretion/-Absorption über CFTR [231]. Im Herz könnte die SGK an verschiedenen Erregungs- oder Repolarisationsprozessen beteiligt sein, da sie auch den spannungsabhängigen Na⁺-Kanal SCN5A und den spannungsabhängigen K⁺-Kanal KCNE1/KCNQ1 reguliert [73].

Für die SGK konnte eine Funktion in der Regulation von Apoptose und Zellproliferation gezeigt werden [36, 135, 226]. Sie vermittelt dabei die anti-apoptotische Wirkung von Glucocorticoiden [156].

Eine Rolle in der Volumenregulation von Zellen über eine Veränderung von Kationen- und Cl⁻-Leitfähigkeit ist wahrscheinlich und z.T. auch schon nachgewiesen [16, 31, 125].

1.3 Oozyten von *Xenopus laevis* als Expressionssystem

Ursprünglich ein diagnostisches Hilfsmittel bei Schwangerschaftstests [98] wird der südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* (Abb. 7) seit langem für Forschungszwecke im Bereich der Nierenphysiologie und Entwicklungsbiologie im Labor gehalten. Seine Oozyten werden für die Expression heterologer RNA im Labor genutzt [60, 61, 99].



Abb. 7: *Xenopus laevis*.

Neben der Fähigkeit heterologe Proteine nach Injektion von RNA zu exprimieren, bieten die Oozyten von *Xenopus laevis* eine Vielzahl technischer Vorteile.

X. laevis ist als obligat aquatisches Tier ohne viel Aufwand im Labor zu halten, zudem ist die Anschaffung günstig. Anästhesie und Oozytenentnahme gestalten sich ebenfalls einfach. Ein großer Zelldurchmesser der Eizellen (ca. 1,3 mm) erleichtert die allgemeine Handhabung wie Aussortieren und Inkubation, ermöglicht aber auch eine einfache cRNA-Injektion und das spätere Messen physiologischer Größen mit mehreren intrazellulären Glaskapillaren [203, 230].

Allerdings gibt es beim Gebrauch der Oozyten des afrikanischen Krallenfrosches auch Nachteile, die bei der Interpretation der Messergebnisse berücksichtigt werden müssen. Die Andersartigkeit zu mamalischen Zellen lässt nicht automatisch den Rückschluss zu, dass Proteine, die üblicherweise nach der Translation noch verschiedene Veränderungen (z.B. Phosphorylierungen

und Glykosylierungen) erfahren, in den Oozyten gleich bearbeitet werden wie in mamalischen Zellen. Dieses kann die Eigenschaften beispielsweise von Membrankanälen verändern. Für viele Neurotransmitter-Rezeptoren und spannungsgesteuerte Ionenkanäle konnte allerdings gezeigt werden, dass sie ihre natürlichen Eigenschaften behalten [57].

	$C_{\text{intrazellulär}}$
Na^+	4-23 mM
K^+	76-148 mM
Cl^-	24-62 mM
Ca^{2+}	$3-100 \cdot 10^{-6}$

Tab. 2: Intrazelluläre Ionenkonzentration in *Xenopus* Oozyten

Endogene Kanäle und Transportsysteme in der Membran sind aufgrund der nicht notwendigen Nährstoffaufnahme zwar nicht sehr ausgeprägt vorhanden, müssen aber in die Betrachtung der Ergebnisse mit einbezogen werden, zumal Entfernung der Follikelmembran diese entscheidend verändert (siehe unten) [57, 240-243]. Hier sind insbesondere K^+ - und Cl^- -Kanäle zu nennen. Ein weiteres Problem könnte in einer anderen Ausstattung an second-messenger-Systemen gegenüber Säugerzellen liegen. Dies würde bedeuten, dass es in den Oozyten andere Regulationswege gibt [57]. Die gemessenen Werte für die intrazelluläre Ionenzusammensetzung sind sehr unterschiedlich (Tab. 2), ein Umstand, der zu scheinbar veränderten Eigenschaften von heterolog exprimierten Membrankanälen führen könnte [240].



Abb. 8: *Xenopus* Oozyten.

Die *Xenopus* Oozyten selbst sind von vier Membranschichten umgeben. Bei Defollikulierung werden die äußeren drei Schichten durch die Behandlung mit Kollagenase entfernt und nur eine innere - „Vitellinmembran“ genannte - Schicht bleibt. Die Oozyten bestehen aus zwei unterschiedlichen Hemisphären (Abb. 8), der animalischen und der vegetalischen. Erstere ist durch Einlagerung von Melanin dunkel gefärbt und enthält den größten Anteil an Mikrovilli, des endoplasmatischen Retikulums und calciumabhängiger Chloridkanäle. Die vegetalische Seite ist hell gefärbt und ist unter physiologischen Bedingungen der Eintrittsort des Spermiums [57, 203].

1.4 Fragestellung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll mit Hilfe von elektrophysiologischen Messungen an *Xenopus* Oozyten der Beitrag und Angriffspunkt der Serum- und Glucocorticoid-abhängigen Kinase SGK und ihrer Isoformen in der Regulation von Na⁺/K⁺-ATPase und Kaliumleitfähigkeit näher untersucht werden (Abb. 9):

1. Ist die aldosteronabhängige schnelle Stimulation der Na⁺/K⁺-ATPase von der SGK vermittelt, wie es für die Hochregulation von ENaC bekannt ist?
2. Gibt es in diesem Zusammenhang auch einen Einfluss der SGK auf die Regulation von ROMK?
3. Über welchen Mechanismus stimuliert die SGK1 den spannungsabhängigen Kaliumkanal K_v1.3 und können daraus allgemeine Rückschlüsse auf eine Wirkungsweise dieser Kinase gezogen werden ?

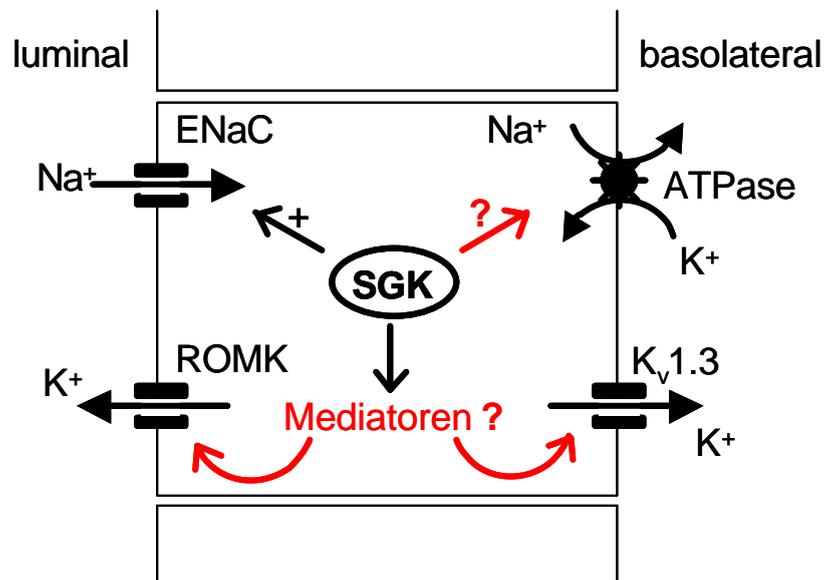


Abb. 9: Wirkungen der SGK auf Na⁺- und K⁺-Resorption.

2 Methoden

2.1 Lösungen/Substanzen

A) OR-2

Die OR-2 Lösung wurde für die Kollagenisierung der Oozyten benutzt. Sie ist Ca^{2+} -frei, was die Kollagenasewirkung verbessert.

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

Tab. 3: OR-2, pH 7,8.

B) Aufbewahrungslösung der Oozyten (ND96 mit Antibiotika)

Nach der Kollagenisierung wurden die Oozyten in 200mOsm ND96-Lösung aufbewahrt. Gentamycin verhindert als Antibiotikum Infektionen der Zellen. Theophyllin hemmt die weitere Reifung [230].

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 $\mu\text{g/l}$

Tab. 4: ND96 mit Antibiotika, pH 7,4.

C) Messlösungen

Die für die Messungen verwendeten Lösungen basierten auf ND96 als Grundlösung (Tab. 5). Der pH-Wert dieser Lösung war in allen Experimenten mit NaOH auf pH 7,4 titriert.

Substanz	Konzentration [mM]
NaCl	96
KCl	2
CaCl ₂	1,8
MgCl ₂	1
Tris-Hepes	5

Tab. 5: ND96, pH 7,4.

Für einzelne Versuche musste während der Messung oder zur Inkubation KCl entfernt werden und/oder BaCl₂ hinzugefügt werden, dieses wurde zunächst isoosmolar durch NaCl ersetzt. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurde der Ausgleich der Osmolarität durch Succrose erreicht. Die Osmolarität der Lösungen wurde also während des Versuchs nicht geändert.

D) Weitere Substanzen

Die verwendeten Substanzen wurden als Stammlösung angesetzt und auf die angegebene Konzentration verdünnt.

- Ouabain (0,1mM)
- Brefeldin A (5µM)
- Margatoxin (1 nM)

Die Chemikalien wurden von der Firma SIGMA in München bezogen.

2.2 Oozytenpräparation

Zur Gewinnung der Oozyten wurde ein adulter weiblicher *Xenopus laevis* (Südafrikanischer Krallenfrosch) für die Narkose ca. 20 Minuten in 0,1%ige 3-Aminobenzoessäureethylester-Lösung gelegt. Danach wurde der Frosch auf dem Rücken liegend auf Eis gelagert und am Bauch gründlich desinfiziert.

Unter semisterilen Bedingungen wurde quer am rechten oder linken Unterbauch ein ca. 0,5 - 1 cm langer Schnitt in die Haut und anschließend in den Muskel gesetzt. Nun konnten die bindegewebigen Ovarialsäckchen scharf herausgetrennt werden. Nach Entnahme der Oozyten wurde die Wunde mittels resorbierbarem Faden durch Muskel- und Hautnaht wieder verschlossen. Der Frosch wurde zum Aufwachen in einen mit wenig Wasser gefüllten Käfig gelegt, bevor er nach mehreren Stunden wieder zurück ins Aquarium gebracht wurde. Die Ovarialsäckchen wurden mit Pinzette und Schere in kleine Einheiten getrennt und mit Kollagenase A (1-3 g) in OR2 unter ständiger Bewegung denudifiziert. Der Kollagenaseverdau dauerte bei Raumtemperatur ca. 2-3 Stunden und wurde durch häufiges Spülen mit ND96 beendet, wenn auf den Oozyten keine Blutgefäße mehr sichtbar und die Zellen zum Großteil vereinzelt waren.

Unter dem Binokular wurden die Oozyten anschließend nach Vitalitätszustand und Reifegrad sortiert. Es wurden nur Zellen verwendet, die sich im Stadium V und VI befanden [68], eine klare Trennung zwischen Vegetal- und Animalpol aufwiesen und keine Aufhellung im Animalpol zeigten.

Die Oozyten wurden dann in ND96 mit Antibiotika bei 18°C aufbewahrt, bevor sie am nächsten Tag zur Injektion verwendet wurden.

2.3 cRNA-Synthese/Injektion

cRNA-Synthese

In *Xenopus laevis* Oozyten kann *in vitro* synthetisierte cRNA exprimiert werden [99]. Dafür wurden zunächst die cDNA durch Transfektion kompetenter Bakterien (*E.coli*, Stamm DH5a) mit der jeweiligen cDNA vermehrt [50, 189]. Der Erfolg der Transfektion wurde durch Minipräparation am folgenden Tag kontrolliert. Mittels Maxipräparation wurde die Plasmid-DNA gewonnen. Die Linearisierung der Plasmid-DNA erfolgte an einer Restriktionsstelle am 3'-Ende des Inserts mit einem Restriktionsenzym entsprechend des Vektors. Nach Aufreinigung der cDNA (Lagerung bei -20°C) wurde cRNA (*in vitro* Transkription) mittels Restriktionsverdau durch die entsprechende Polymerase

hergestellt. Die cRNA wurde als Stocklösung (ca. 1-2 µg/µl) bei -80°C aufbewahrt. Die molekularbiologischen Methoden wurden von Frau Noll durchgeführt. Die verwendeten Vektoren, Restriktionsenzyme und Polymerasen sind in Tab. 6 zusammengestellt.

Protein	Vektor	Restriktionsenzym	Polymerase
ROMK	pSport	Not1	T7
SD	PGem-HJ	STUI	T7
KN	PGem-HJ	STUI	T7
SGK1-3	PGem-HJ	STUI	T7
K _v 1.3	PSP64T	EcoR1	Sp6
NHERF2	PET30a	SAL1	T7
Nedd4-2	PSPeasy	BGL II	Sp6

Tab. 6: Bei der Herstellung der jeweiligen cRNA verwendeten Vektoren, Restriktionsenzyme und Polymerasen.

Injektion

Zur Injektion der Oozyten wurden Borosilikatglaskapillaren (Fa. Hilgenberg) mit einem Außendurchmesser von 1,2 mm mit einem vertikalen Kapillarziehgerät (DMZ-Universal Puller, Fa. Zeitz) so gezogen, dass sie eine lange Spitze hatten. Die Spitze wurde unter dem Mikroskop abgebrochen, so dass eine Öffnung von ca. 10-20 µm entstand. Danach wurden die Glaskapillaren mit Paraffinöl gefüllt, um sie luftfrei zu machen. Ein Tropfen der mit DEPC-Wasser auf Endkonzentration verdünnten cRNA wurde dann mit Hilfe eines Mikroinjektors aufgesaugt. Um Wegrutschen zu verhindern, wurden die Oozyten in einer mit ND96 gefüllten kleinen Petrischale auf einem Gitter angeordnet und jeweils mit 25 nl cRNA unter dem Binokular injiziert. Die übliche Konzentration der cRNA betrug für die Kinasen 300 ng/µl, für K_v1.3 5 ng/µl und für ROMK1 100 ng/µl, was cRNA Injektion von 7,5 ng, 0,125 ng und 2,5 ng pro Oozyte entspricht. Alle cRNA-Injektionsschritte müssen unter semisterilen Bedingungen durchgeführt werden, um eine Kontamination mit RNAsen zu vermeiden.

Bei Expression von mehreren Proteinen wurden die einzelnen cRNA's nacheinander injiziert. Der Abstand zwischen Kinase und Regulatoren betrug 1-2 Stunden, die Kanal-RNA wurde am folgenden Tag injiziert.

Nach 2-5 Tagen erfolgte die Messung der durch das injizierte Protein modulierten Ströme.

2.4 Elektrophysiologische Methoden

2.4.1 Potentialmessung (current clamp)

Mit Hilfe der „Current-Clamp“-Methode kann das Membranpotential (V_m) einer Zelle gemessen werden. Dazu wird die Potentialdifferenz einer intrazellulären Mikropipette gegenüber geerdeten Referenzelektroden im Bad ermittelt. Die elektrische Verbindung ist durch Ag/AgCl gegeben [195]. Für die Mikroelektroden wurden Kapillaren aus Borosilikatglas (Typ GC150TF-15; 1,5 mm Außendurchmesser; 1,17 mm Innendurchmesser; dünnwandig mit Filament; Fa Clark Elektromedical Instruments, Pangborne, GB) mit einem vertikalen Kapillarziehgerät (DMZ-Universal Puller, Fa. Zeitz) gezogen, mit 3 M KCl-Lösung gefüllt und über einen chlorierten Silberdraht mit dem Verstärker verbunden. Die Referenzelektroden waren über 3% Agar und ebenfalls 3M KCl-Lösung mit dem Bad verbunden [8] (Abb. 10). Alle verwendeten Mikroelektroden hatten einen Gesamtwiderstand von 0,3-1 MO. Vor dem Einstechen der Mikroelektrode wird ein Nullabgleich mit der Badlösung gemacht ($0 \pm 1\text{mV}$).

Die Fließgeschwindigkeit der Badlösung betrug 20 ml/min, so dass in ca. 15 s ein kompletter Austausch der Messkammerlösung zu erwarten war. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Messapparatur wurde mittels Faraday`schem Käfig bestmöglich gegenüber elektromagnetischen Einflüssen aus der Umwelt abgeschirmt [170]. Die Daten wurden mit 10 Hz gefiltert und über ein MacLab-Interface in einem Macintosh-Computer aufgenommen. Als Software fand das Programm *Chart* (Version 3.5.2) sowie *Scope* (Version 3.5.2) von AD Instruments (MacLab) Anwendung.

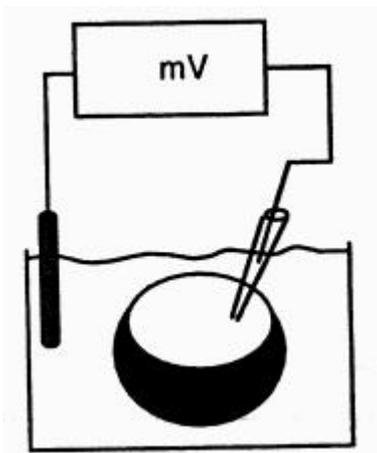


Abb. 10: Versuchsaufbau für Messungen im Current-Clamp-Modus.

2.4.2 Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp (TEVC)

Mit der TEVC-Methode ist es unter Verwendung einer weiteren intrazellulären Mikroelektrode möglich, das Membranpotential der *Xenopus laevis* Oozyte auf ein beliebiges Potential zu klemmen und den Strom zu messen, der nötig ist, um die Zelle auf dem gewünschten Potential zu halten. Hierbei wird über die Spannungselektrode (E_v) das aktuelle Potential (V_m) der Zelle gemessen, im Rückkopplungsverstärker (FBA) (GeneClamp Amplifier, Axon Instruments) verstärkt und mit dem vom Experimentator eingestellten Haltepotential (V_{hold}) verglichen. Aus der Differenz dieser Signale ergibt sich der Strom (I_{hold}), der nötig ist, um das Haltepotential zu erreichen. Er wird über die Stromelektrode (E_i) appliziert, fließt durch die Membran und wird über die Badelektrode gemessen [4, 65, 103, 253]).

Der gemessene Strom I_{hold} entspricht dem Ionenstrom durch die Oozytenmembran mit dem Membranwiderstand R_m bei einem entsprechenden Haltepotential V_{hold} . Es gilt das Ohm'sche Gesetz $R=V/I$. Definitionsgemäß reflektiert ein negativer Strom einen Einstrom positiver Ionen in die Zelle und umgekehrt.

Wird nun eine Substanz gegeben, die elektrogen über die Membran transportiert wird, oder wird die Öffnungswahrscheinlichkeit einer transmembranösen Pore verändert, ändert sich der Membranwiderstand (R_m), und mit ihm der zur Aufrechterhaltung des vorgegebenen Potentials (V_{hold}) zu applizierende Strom (I_{hold}). Diese Änderung kann als induzierter Strom

gemessen werden. Die übrigen Messanordnungen entsprechen den Angaben bei der Potentialmessung.

Pulsprotokolle

Um den Zusammenhang von Membranpotential und Ionenkanalstrom sowie um das Umkehrpotential zu ermitteln (IV-Diagramm) wurden für die beiden K^+ -Kanäle unterschiedliche Pulsprotokolle angewandt.

Für den ROMK1 wurde von einem Haltepotential von -80 mV in Schritten von 10 mV für jeweils 1 s auf das Testpotential zwischen -100 mV und $+40$ mV geklemmt. Zwischen den Testpotentialen wurde die Oozyte für 1 s auf das Haltepotential geklemmt.

Für den spannungsaktivierten $K_v1.3$ wurde von einem Haltepotential von -80 mV in 20 mV Schritten für jeweils 5 s auf das Testpotential zwischen -60 mV und $+40$ mV geklemmt. Zwischen den Testpotentialen wurde die Oozyte für 40 s auf das Haltepotential geklemmt.

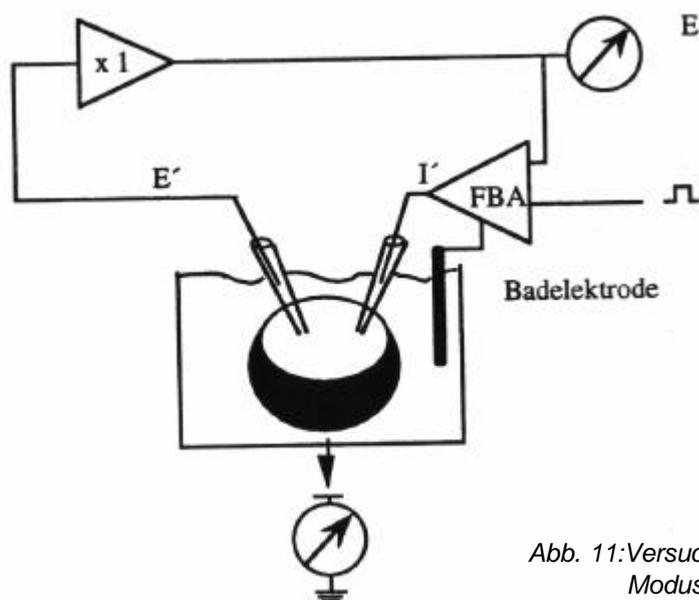


Abb. 11: Versuchsaufbau im Voltage-Clamp-Modus.

2.4.3 Messung des Pumpstromes der Na^+/K^+ -ATPase

Aufgrund der elektrogenen Eigenschaften der Na^+/K^+ -ATPase ist eine Messung ihrer Aktivität mit Hilfe von elektrophysiologischen Methoden möglich. Die Messung des Pumpstromes der Na^+/K^+ -ATPase erfordert aufgrund der

geringen Leitfähigkeit und der ständigen Aktivität zur Aufrechterhaltung der Ionengradienten ein spezielles Messprotokoll.

In Anwesenheit von extrazellulären Kalium erzeugt die Pumpe einen Auswärtsstrom, da drei Na^+ im Austausch gegen zwei K^+ nach außen transportiert werden (Abb. 12). Ist das Inkubationsmedium K^+ -frei, kommt es zum Stillstand der Pumpe, da das extrazelluläre Substrat fehlt. Bei Inkubation über einen längeren Zeitraum in K^+ -freiem Medium steigt also die intrazelluläre Na^+ -Konzentration an, da es nicht mehr aus der Zelle entfernt werden kann. Dieses sogenannte „Natriumloading“ kann durch Erhöhung der extrazellulären Na^+ -Konzentration oder durch Wegnahme von Ca^{2+} und dadurch vergrößerter unspezifischer Durchlässigkeit der Membran noch verstärkt werden [55, 106, 114, 155]. Durch Gabe von Amilorid kann der Einstrom von Natrium in die Zelle gehemmt werden (Abb. 12).

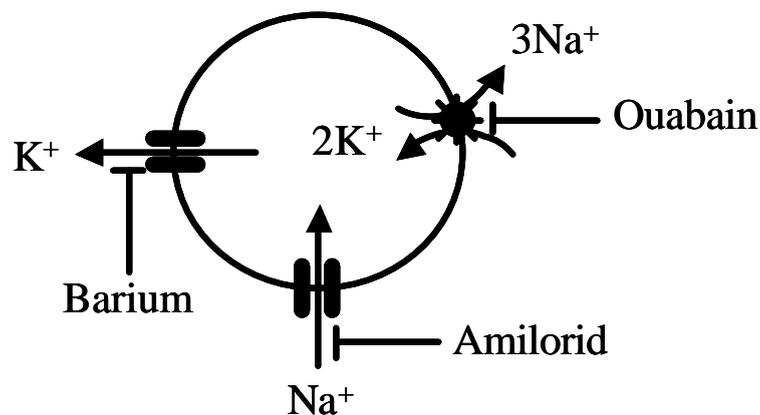


Abb. 12: Für die Messung der Na^+/K^+ -ATPase relevante transmembranöse Transportvorgänge.

Wenn durch Ba^{2+} oder Tetraethylammoniumionen (TEA^+) in der Badlösung die normalerweise hohe basale Kaliumleitfähigkeit geblockt ist [55, 106, 184, 224], kann durch Gabe von Kalium in die Badlösung bei einem auf einen festen Wert geklemmten Membranpotential ein Auswärtsstrom gemessen werden. Dieser Strom ist durch Ouabain hemmbar und reflektiert daher den von der Na^+/K^+ -

ATPase erzeugten Strom (Abb. 13, Abb. 12). Eine vollständige Blockade der endogenen Pumpe durch Ouabain ist bereits mit 10 μM zu erreichen [70, 101, 155].

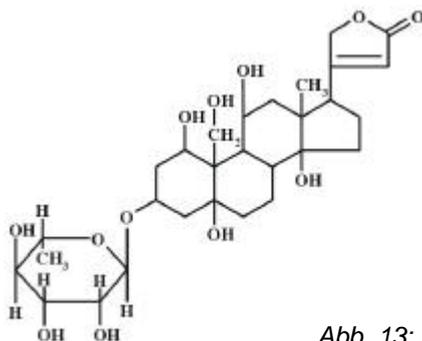


Abb. 13: *g*-Strophanthin (Ouabain).

Der K_M -Wert der endogenen Na^+/K^+ -ATPase für extrazelluläres Kalium ist etwa 1 mM bei pH 7,4 und einem Membranpotential von -30 mV [184, 224]. Mit 5 mM K^+ ist dementsprechend Sättigung erreicht.

2.4.4 Ionenselektive Elektroden

Die Messung der intrazellulären Na^+ - und pH_i -Aktivitäten wurde ebenfalls mit Kapillaren aus Borosilikatglas (Typ GC150TF-15; 1,5 mm Außendurchmesser; 1,17 mm Innendurchmesser; dünnwandig mit Filament; Fa Clark Elektromedical Instruments, Pangborne, GB) durchgeführt, die mit einem vertikalen Kapillarziehgerät (DMZ-Universal Puller, Fa. Zeitz) gezogen waren. Damit eine gute Verbindung zwischen dem hydrophilen Glas und der später eingefüllten hydrophoben Ionophore möglich ist, wurde die Kapillare mit 5% Tributylchlorosilane gefüllt und danach bei 400°C für 5 min gebacken, um eine gute Auskleidung der Glaswände und die Verdunstung der Flüssigkeit zu erreichen [195]. Danach wurden die Kapillaren mit einer ca. 300 μm langen Säule aus Na^+ -Ionophore (sodium ionophore I-cocktail A, Fluka) oder H^+ -Ionophore (hydrogen ionophore II-cocktail A, Fluka) gefüllt. Für die Messungen der intrazellulären Na^+ -Aktivität wurde die Elektrode dann mit 100 mM NaCl aufgefüllt, für die Messungen des intrazellulären pH mit 100 mM Na-Citrat (pH 6.0).

Die Na⁺-Elektroden wurden dann mit 1 mM, 10 mM und 100 mM NaCl Lösung geeicht, die pH-Elektroden mit Lösungen von pH 6.0, 7.0 und 8.0. Nur die Elektroden, die eine lineare Steigung von mehr als 50mV/pNa⁺ Einheit oder pH Einheit hatten, wurden für die Messungen genommen [66, 230].

Auf Basis dieser Kalibrierung wurde die intrazelluläre Na⁺-Aktivität nach folgender Gleichung errechnet.

$$(1) \quad pNa^+_i = pNa^+_{ref} - (V_{Na^+} - V_m) / S$$

Dabei ist pNa⁺_{ref} die Na⁺-Konzentration der Kontroll-Lösung und S die Steigung der Elektrode, wie sie oben ermittelt wurde. Mit der Na⁺-Elektrode wurde das chemische Potential für Na⁺_i (V_{Na⁺}) und gleichzeitig mit Hilfe einer zweiten intrazellulären Elektrode (gefüllt mit 3 M KCl) das Membranpotential (V_m) der Oozyte gemessen [52].

In gleicher Weise wurde der pH_i mit zwei intrazellulären Elektroden errechnet:

$$(2) \quad pH_i = pH_{ref} - (V_{H^+} - V_m) / S$$

Dabei ist pH_{ref} der pH-Wert der Kontroll-Lösung und S die Steigung der Elektrode, wie sie oben ermittelt wurde. Mit der pH-Elektrode wurde das chemische Potential für H⁺ (V_{H⁺}), mit der zweiten Elektrode das Membranpotential (V_m) der Oozyte gemessen [52].

2.5 Durchführung der Experimente

Alle Messungen wurden 24 Tage nach cRNA-Injektion bei Raumtemperatur durchgeführt. Während der Messung wurde die Oozyte in der Messkammer ständig von der entsprechenden Badlösung umspült, wobei die Fließgeschwindigkeit 20 ml/min betrug und die Messkammerflüssigkeit innerhalb von 10-15 s komplett ausgetauscht war.

Alle Experimente wurden mehrfach von verschiedenen Präparationen an unterschiedlichen Tagen durchgeführt. Dies führte zu keinen qualitativ unterschiedlichen Ergebnissen, lediglich die Größe der Ströme insgesamt variierte von Präparation zu Präparation und abhängig von der Expressionszeit. Bei einer Reihe von Untersuchungen zur Na⁺/K⁺-ATPase, die nachträglich im

Winter gemacht wurden, fiel allerdings ein generell kleinerer Pumpenstrom auf. Ob dies auf eine jahreszeitliche Varianz oder die möglicherweise etwas unterschiedliche Raumtemperatur zurückzuführen war, ließ sich nicht eindeutig klären. Wiederum war das qualitative Ergebnis unverändert.

2.6 Auswertung und Statistik

Von den Versuchsergebnissen wurden, falls nicht anders beschrieben, Mittelwerte und Standardfehler (SEM) bestimmt. „n“ gibt dabei die Anzahl voneinander unabhängiger Messungen an. Die Messungen wurden jeweils an Oozyten von mindestens drei verschiedenen Fröschen durchgeführt. Beim Vergleich der Mittelwerte von zwei Gruppen wurden die Werte auf Normalverteilung getestet (Shapiro-Wilk-Test) und mit dem ungepaarten, zweiseitigen Student t-Test auf Signifikanz überprüft. Nur Werte mit $p < 0,05$ wurden als signifikant angesehen und mit * gekennzeichnet. Wenn die Mittelwerte von mehr als einer Gruppe mit einer Kontrollgruppe verglichen wurde, fand eine ANOVA mit Dunnetts-Test als Post-Test Anwendung, beim Vergleich aller Gruppen untereinander mit Tukey-Kramer-Test. Wenn beim Vergleich von zwei Gruppen unterschiedliche Varianzen auftraten, wurde der Welch-Test angewendet. Waren die erhobenen Daten nicht normalverteilt wurden die Werte logarithmiert und die jeweiligen Tests wiederholt. War dieses Vorgehen nicht möglich wurden nicht parametrische Tests (Mann-Whitney Test für zwei Gruppen und Kruskal-Wallis-Test für mehr als zwei Gruppen) benutzt. Auch in diesen Fällen wurde das Signifikanzniveau auf $p < 0,05$ gesetzt und signifikante Unterschiede der Mittelwerte mit * gekennzeichnet.

Für die Ermittlung der Verschiebung des Umkehrpotentials wurde das Umkehrpotential jeder einzelnen Oozyte für die unterschiedlichen Bedingungen ermittelt und aus den einzelnen Differenzen der Mittelwert mit Standardfehler errechnet.

Um die Leitfähigkeits-Potentialbeziehungen des $K_v1.3$ zu charakterisieren, wurden die ermittelten Leitfähigkeiten auf die maximale Leitfähigkeit normalisiert. Die Werte wurden für jede einzelne Oozyte mit der Hill-Funktion

(3) gefittet und daraus das Potential bei halbmaximaler Leitfähigkeit $V_{1/2}$ als Mittelwert und Standardfehler ermittelt:

$$(3) \quad y = \frac{1}{1 + \left(\frac{V}{V_{1/2}}\right)^c}; \text{ mit } c=5 \text{ als mittleren Steilheitskoeffizient.}$$

Zur Ermittlung der zeitabhängigen Inaktivierungskonstante τ_{inact} des $K_v1.3$ wurde der Strom auf den jeweiligen Spitzenstrom 0,2 s nach Beginn des Pulses auf 20 mV einer Oozyte bezogen und mit folgender Funktion (4) angenähert:

$$(4) \quad y = y_0 + \frac{1 - y_0}{1 + \left(\frac{t - 0.2}{\tau_{\text{inact}}}\right)^b}; \text{ mit } y_0 \text{ als Asymptote und } b \text{ als Steilheitskoeffizient.}$$

Die Abhängigkeit der Hemmung des $K_v1.3$ -Stromes durch Nedd4-2 von der injizierten RNA-Menge wurde nach mit einer Exponentialfunktion (5) angenähert und logarithmisch dargestellt:

$$(5) \quad y = y_0 + A \cdot e^{-x/\tau_{\text{inact}}}; \text{ mit } A \text{ als maximalen Strom und } y_0 \text{ als Asymptote.}$$

2.7 Fehlerdiskussion

2.7.1 Oozytenpräparation

Die Qualität der Oozyten war unterschiedlich von Präparation zu Präparation. Dieses zeigte sich insbesondere durch ihren basalen Leckstrom. Um diese Unterschiede auszugleichen, wurden stets mehrere Versuchsreihen mit Zellen aus unterschiedlichen Präparationen durchgeführt.

Auf eine möglichst genaue Kontrolle der Injektionsmenge von cRNA wurde durch Verwendung von hochpräzisen Mikroinjektoren geachtet. Dies war insbesondere wichtig, da durch die Messungen eine unterschiedliche Aktivität der Transporter und Kanäle unter dem Einfluss von SGK gezeigt werden sollte. Ungenaue Injektion hätte auch zu unterschiedlicher Expression und damit Aktivität geführt. Durch hohe Zellzahl und mehrmalige Wiederholungen der Messungen konnten die hierdurch entstehenden unsystematischen Fehler ausgeglichen werden.

2.7.2 Lösungen und Geräte

Eventuelle, von anderen Geräten ausgehende, elektrische Störungen wurden durch einen Faraday'schen Käfig weitgehend abgeschirmt.

Der Widerstand der Elektroden, der durch Verstopfen der Spitzen verändert sein konnte, wurde regelmäßig kontrolliert, und wenn nötig, wurden die Glaselektroden ausgewechselt. Für eine gute Beschichtung der AgCl-Elektrode wurde durch regelmäßiges Chlorieren des Silberdrahtes gesorgt.

Die Lösungen wurden aus 10-facher Stammlösung vor jedem Versuch hergestellt. Die Gesamtmolarität und der pH der Lösungen wurde dabei vor jedem Versuch kontrolliert.

2.7.3 Auswertung

Bei der Beurteilung und Auswertung der Ergebnisse ist besonders auf die Größe der Ströme und die Genauigkeit der Messungen einzugehen. Verschiedene Einflüsse führen zu Schwankungen und Abweichungen des basalen Stromes in den Oozyten. Es wurde deshalb auf einen linearen, stabilen Verlauf des Stromes geachtet, bevor die durch Substratgabe erzeugten Differenzen der Ströme ermittelt wurden.

Für die Messungen mit der endogenen Na^+/K^+ -ATPase liegen die Ströme bei den ersten Versuchsreihen mit 10 - 40 nA im sehr gut messbaren Bereich. Bei der Versuchsreihe mit den Isoformen der Kinase sind die Ströme quantitativ kleiner, aber qualitativ vergleichbar. Da dieses aber in allen Gruppen inklusive der Wasser- und $^{\text{S}422\text{D}}$ SGK1-injizierten der Fall war, muss auf eine allgemeine Ursache geschlossen werden. Veränderte Oozytenqualität oder Einfluss der Jahreszeit könnte in Betracht gezogen werden, da die letzten Messungen im Winter durchgeführt wurden, während der Zeitpunkt für die ersten Messungen im Sommer lag [57].

3 Versuche und Ergebnisse

3.1 Na⁺/K⁺-ATPase

Wie oben erwähnt ist die Na⁺/K⁺-ATPase in jeder tierischen Zelle vorhanden und für die Aufrechterhaltung der Konzentrationsgradienten für Na⁺ und K⁺ verantwortlich. Es handelt sich also um ein Membranprotein das auch endogen in den Oozyten von *Xenopus laevis* exprimiert ist.

Überlegungen zum Messprotokoll sind in Kap. 2.4.3 beschrieben, siehe auch Abb. 12.

3.1.1 5 Stunden K⁺-freie Inkubation

Zunächst wurden jede Oozyte für 5 Stunden in K⁺-freier ND96 Lösung inkubiert. Dieses führt zu einem Anstieg der intrazellulären Na⁺-Konzentration. Ca²⁺ wurde in der Inkubationslösung belassen, da dieses zu vielfältigen unspezifischen Effekten an der Zellmembran führt, die mit der Regulation durch die SGK interferieren könnten [242]. Die Zellen wurden in der Inkubationszeit bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde die Oozyte in die Messkammer eingebracht.

In der Messkammer war zunächst K⁺-freie Lösung. Dann wurde im „current-clamp“ Modus (CC) 5 mM BaCl₂ zugegeben, was zu einer Depolarisation durch Blockade der K⁺-Kanäle führte. Auf zusätzliche Gabe von TEA⁺ verzichteten wir, da dies neben Hemmung der Kaliumleitfähigkeit auch eine Hemmung der Na⁺/K⁺-ATPase bewirkt (Kap. 1.1.1).

Gabe von 5 mM KCl in die Badlösung führte dann zu einer Hyperpolarisation, die zum großen Teil durch die anspringende Na⁺/K⁺-ATPase entsteht, da die Kaliumleitfähigkeit der Zelle geblockt ist. Nach erneuter Wegnahme von KCl aus der Messkammer wurde in den „voltage-clamp“ Modus (VC) geschaltet und ein Membranpotential von -30mV eingestellt. Erneute Zugabe von 5 mM KCl löste nun einen auswärtsgerichteten Strom aus (Abb. 14).

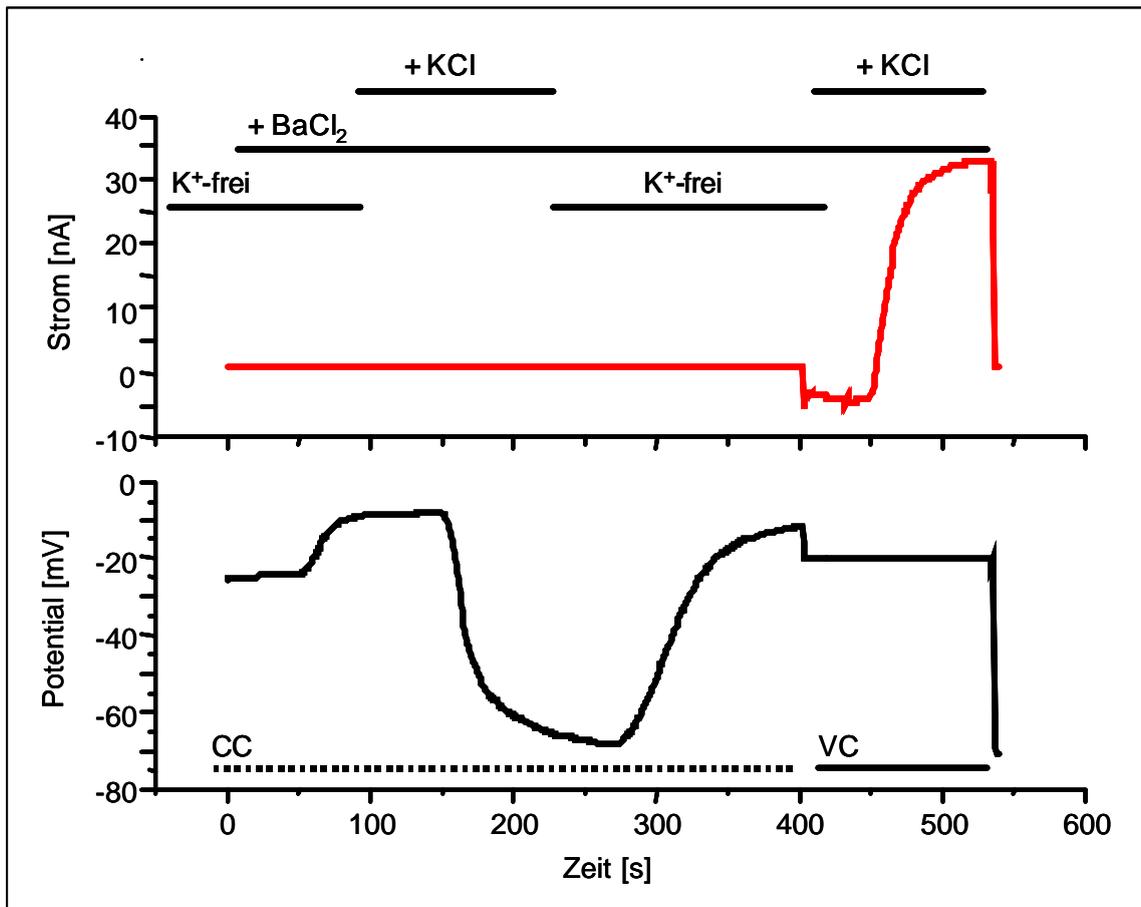


Abb. 14: Originalspur nach K⁺-freier Inkubation über 5 Stunden. Messung zunächst im current-clamp (CC), dann im voltage-clamp (VC) Modus. Substratwechsel ist durch waagerechte Linien über den Spuren angezeigt.

Der durch 5 mM KCl ausgelöste Auswärtsstrom war vollständig durch 0,1 mM Ouabain hemmbar (Abb. 15). Wie unter 2.4.3 beschrieben zeigt dieses, dass es sich bei dem Auswärtsstrom um einen von der Na⁺/K⁺-ATPase getragenen Strom handelt (Abb. 12).

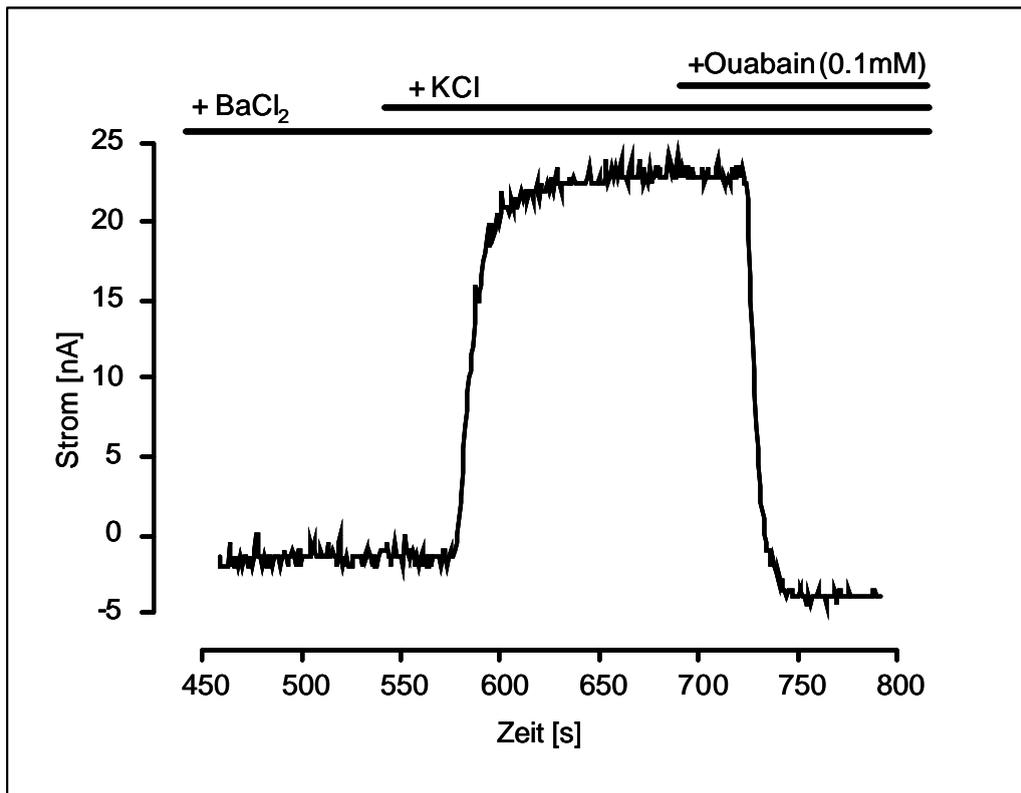


Abb. 15: Hemmung des Auswärtsstromes durch 0,1 mM Ouabain.

In Oozyten, die permanent aktive Mutante der Serum- und Glucocorticoid-abhängigen Kinase (^{S422D}SGK1) exprimierten, war der gemessene Ouabain-hemmbarer Auswärtsstrom ($48,8 \pm 2,9$ nA; $n=23$) signifikant größer als in Oozyten, die permanent inaktive Mutante der Serum- und Glucocorticoid-abhängigen Kinase (^{K127N}SGK1) exprimierten ($17,0 \pm 3,9$ nA; $n=21$). Der Ouabain-hemmbarer Auswärtsstrom in Oozyten, die mit H₂O injiziert waren, lag bei $27,6 \pm 1,5$ nA; $n=4$ (Abb. 16).

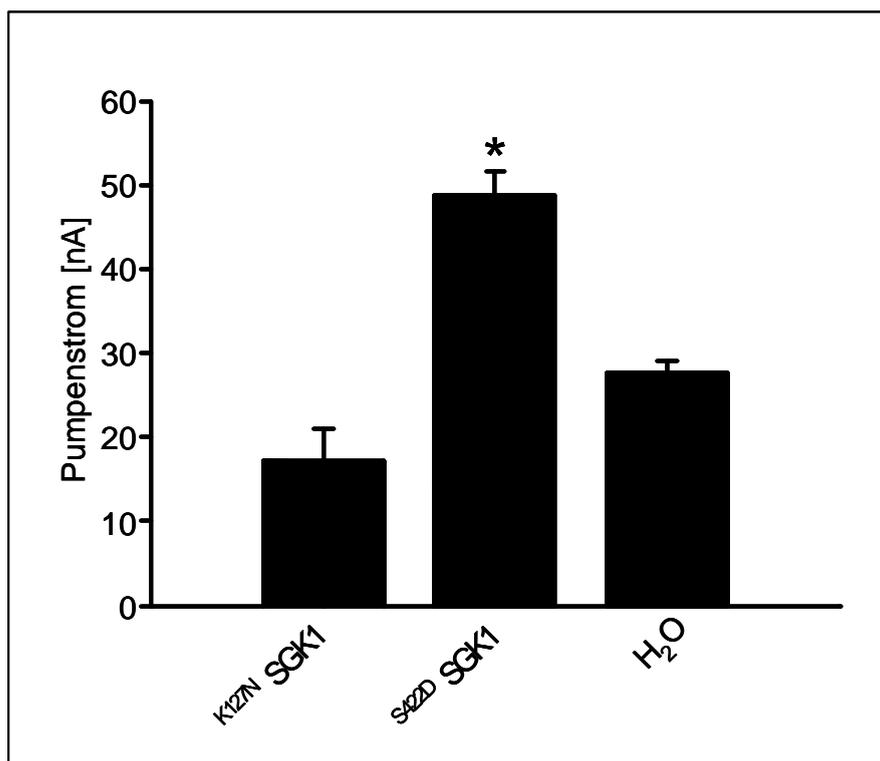


Abb. 16: Pumpstrom in ^{K127N}SGK1 (n=21), ^{S422D}SGK1 (n=23) und H₂O-injizierten Zellen (n=4) nach Gabe von 5 mM KCl. Mittelwerte und Standardfehler, * p<0.05 gegenüber ^{K127N}SGK1.

3.1.2 Na⁺_i-Konzentration und pH_i in SGK-injizierten Oozyten

Intrazelluläre Na⁺_i-Konzentration

Die SGK aktiviert den epithelialen Na⁺-Kanal ENaC, wenn er heterolog in *Xenopus* Oozyten exprimiert wird [143, 186, 231]. Möglicherweise werden auch endogene Na⁺-Kanäle in Oozyten durch die SGK reguliert. Dieses würde dann zu einer schnelleren Na⁺-Beladung der Zellen führen und nur sekundär zu einem größeren Pumpstrom, da dieser von der intrazellulären Na⁺-Konzentration (Na⁺_i) abhängt.

Andererseits könnte eine erhöhte Aktivität der Na⁺/K⁺-ATPase ein von vornherein niedrigeres intrazelluläres Natrium (Na⁺_i) in den mit SGK1 injizierten Oozyten bewirken. Erst eine Hemmung der Na⁺/K⁺-ATPase durch Wegnahme von extrazellulärem K⁺ sollte eine Erhöhung und damit ein Angleichen des Na⁺_i in SGK1 injizierten Zellen gegenüber Wasser- oder mit transdominant negativer Mutante der SGK injizierten Zellen bewirken.

Um diese Zusammenhänge genauer zu untersuchen, wurde in Oozyten, die mit transdominant aktiver Kinase (^{S422D}SGK1), transdominant inaktiver Kinase (^{K127N}SGK1) und Wasser injiziert waren, mit ionenselektiven Elektroden die intrazelluläre Natriumkonzentration (Na⁺_i) vor und nach 5-stündiger Inkubation in K⁺-freier Lösung gemessen. Die gemessenen Werte für intrazelluläres Na⁺ liegen im Bereich der in der Literatur beschriebenen Werte. Es zeigte sich, dass das intrazelluläre Na⁺_i in ^{S422D}SGK1-injizierten Oozyten signifikant niedriger war als in Wasser- oder ^{K127N}SGK1-injizierten Kontrollzellen. Der Anstieg von Na⁺_i nach K⁺-freier Inkubation war nur in den ^{S422D}SGK1-injizierten Zellen signifikant (Abb. 17, Tab. 7).

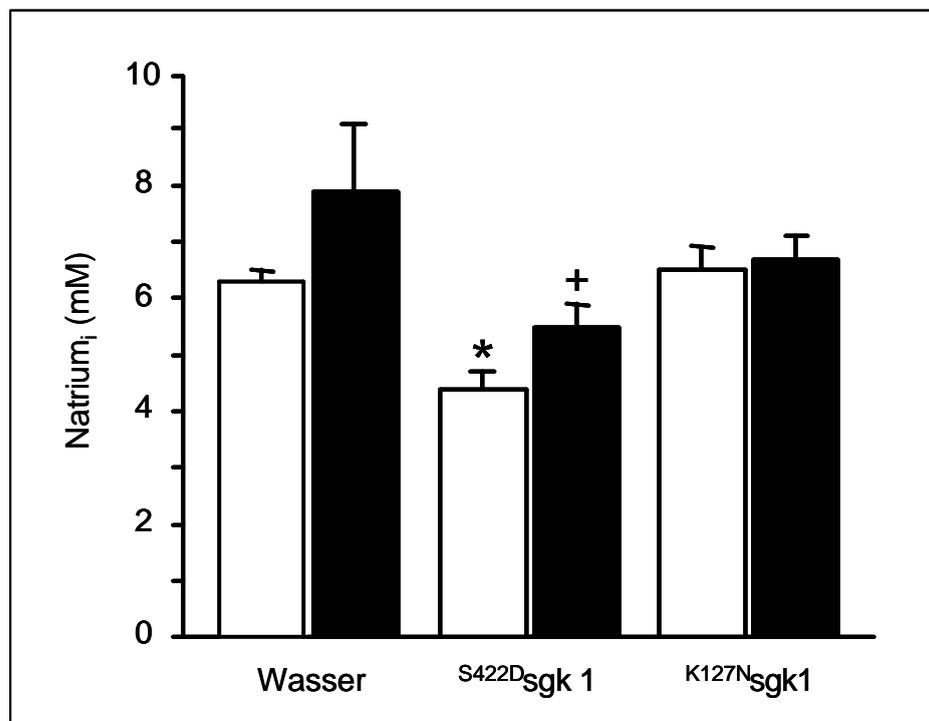


Abb. 17: Intrazelluläre Na⁺-Konzentration vor (□) und nach (■) 5h K⁺-freier Inkubation in Wasser-, ^{S422D}SGK1-, und ^{K127N}SGK1-injizierten Oozyten (jeweils n=5). Mittelwerte und Standardfehler, * p<0.05 gegenüber Wasser, ⁺p<0.05 gegenüber vor Inkubation.

Intrazellulärer pH_i

Auch eine Erhöhung des intrazellulären pH_i kann zu einer Stimulation der Na⁺/K⁺-ATPase führen. Bei steigendem intrazellulärem pH_i müsste über den Na⁺/H⁺-Austauscher mehr H⁺ aus der Zelle gepumpt werden. Dieses würde die

Pumpkraft der Na⁺/K⁺-ATPase steigern. Umgekehrt würde eine Stimulation des Na⁺/H⁺-Austauschers durch die SGK zu verminderter Pumpkraft führen.

Um den Einfluss der SGK auf den intrazellulären pH_i zu untersuchen, haben wir mit ionenselektiven Elektroden den intrazelluläre pH_i in Oozyten gemessen, die mit transdominant aktiver Kinase (^{S422D}SGK1), transdominant inaktiver Kinase (^{K127N}SGK1) und Wasser injiziert waren. Hier zeigte sich bei den nicht K⁺-frei inkubierten Oozyten kein signifikanter Unterschied. Nach 5 Stunden in K⁺-freier Lösung war der pH_i in den ^{S422D}SGK1-injizierten Oozyten aber signifikant kleiner (Tab. 7).

	Na ⁺ _i			pH _i		
	Wasser	^{S422D} SGK1	^{K127N} SGK1	Wasser	^{S422D} SGK1	^{K127N} SGK1
ND96	6.3 ± 0.2	4.4 ± 0.3*	6.5 ± 0.4	7.34 ± 0.02	7.35 ± 0.02	7.32 ± 0.01
5 h K ⁺ -frei	7.9 ± 1.2	5.5 ± 0.4 [†]	6.7 ± 0.4	7.24 ± 0.08	7.05 ± 0.08 [†]	7.17 ± 0.09

Tab. 7: Intrazelluläre Na⁺-Konzentration (Na⁺_i) und intrazellulärer pH (pH_i) in Wasser-, ^{S422D}SGK1-, und ^{K127N}SGK1-exprimierenden Zellen. Mittelwerte ± Standardfehler (jeweils n=5), * p<0.05 gegenüber Wasser, [†]p<0.05 gegenüber vor Inkubation.

3.1.3 10 min K⁺-freie Inkubation

Durch eine lange Wegnahme von K⁺ aus dem Inkubationsmedium können auch verschiedene unspezifische Reaktionen hervorgerufen werden. Um diese unspezifischen Effekte möglichst klein zu halten, wurde in einem neuen Versuchsprotokoll eine kürzere K⁺-freie Inkubation durchgeführt.

Die vorher durchgeführten Messungen mit 5-stündiger K⁺-freier Inkubationszeit, bei denen der Anstieg des intrazellulären Na⁺_i nicht dramatisch war, ließen vermuten, dass auch bei kurzer Inkubationszeit kein großer Anstieg des Na⁺_i zu erwarten sei und damit auch keine indirekten Effekte auf die Na⁺/K⁺-ATPase durch schnellere Na⁺-Beladung der ^{S422D}SGK1 exprimierenden Zellen (s.u.).

Um möglichst geringe unspezifische Beeinflussung der Na⁺/K⁺-ATPase zu erreichen, versuchten wir eine kürzere K⁺-freie Inkubation in der Messkammer.

Pumpstrom

Für dieses Messprotokoll wurden die mit permanent aktiver ^{S422D}SGK1, permanent inaktiver ^{K127N}SGK1 oder H₂O injizierten Oozyten in die Messkammer mit normaler ND96 gelegt. Ca. 5 min. nach dem Einstechen der Elektroden hatte das Membranpotential einen stabilen Wert erreicht, und es wurde in den „voltage clamp“ Modus auf ein Membranpotential von -30 mV etwas oberhalb des Ruhemembranpotentials der Oozyten geschaltet. Nachdem sich der Haltestrom stabilisiert hatte, wurde die Messkammer nun für 10 min mit K⁺-freier Lösung perfundiert. Dieses führte zu einer Zunahme des Haltestroms durch Ausströmen von K⁺.

Daraufhin wurde der K⁺-Strom mit 5 mM BaCl geblockt. Wie Abb. 18 zeigt, war dieser Strom in ^{S422D}SGK1 exprimierenden Oozyten (113,3 ± 8,1 nA; n=29) signifikant größer als in ^{K127N}SGK1 exprimierenden Oozyten (64,2 ± 4,7 nA; n=25) oder Wasser injizierten Oozyten (70,3 ± 9,4 nA; n=16).

Zugabe von 5 mM KCl in die Messkammerlösung führte zu einem Ouabain-sensitiven Auswärtsstrom, der deshalb wiederum die Aktivität der endogenen Na⁺/K⁺-ATPase widerspiegelte. Dieser Auswärtsstrom betrug in den ^{S422D}SGK1 exprimierenden Oozyten 24,7 ± 3,8 nA (n=29), in den ^{K127N}SGK1 exprimierenden Oozyten 9,4 ± 2,0 nA (n=25) und in den H₂O-injizierten Zellen 5,4 ± 2,3 nA (n=16) und war damit in den Oozyten, die die permanent aktive Form der Serum- und Glucocorticoid-abhängigen Kinase SGK1 exprimierten, signifikant größer als in den beiden Kontrollen, die keinen signifikanten Unterschied zeigten (Abb. 18).

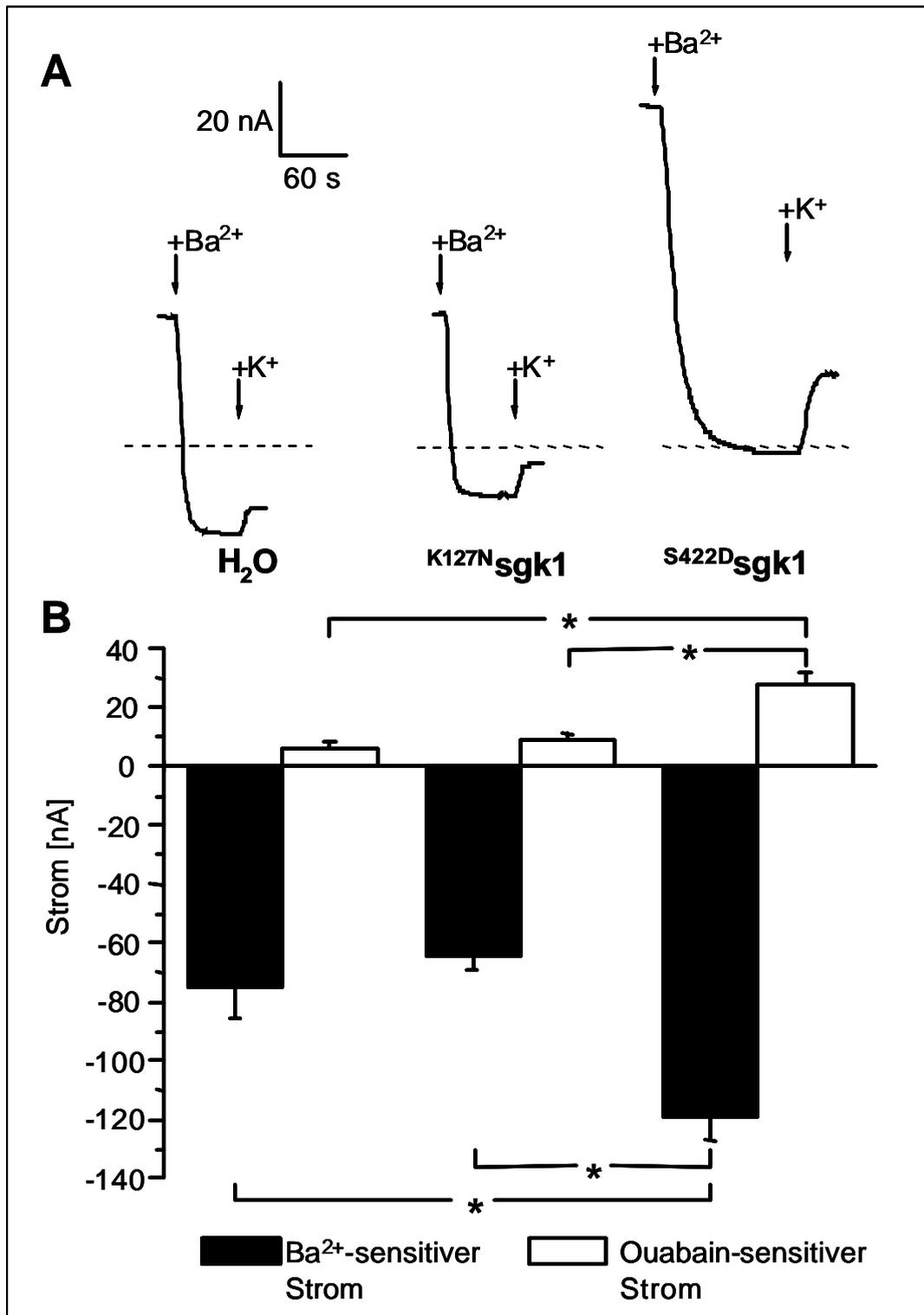


Abb. 18: A. Original-Stromspuren von H₂O-, K^{127N}SGK1- und S^{422D}SGK1 exprimierenden Oozyten. Gabe von Ba²⁺ und K⁺ ist durch Pfeile markiert.
 B. Durch Ba²⁺ gehemmter und durch K⁺ induzierter Strome von H₂O-, K^{127N}SGK1- und S^{422D}SGK1-exprimierenden Oozyten (n=16, n=25 bzw. n=29). Mittelwerte und Standardfehler, * p<0.05.

In allen Gruppen war dieser Auswärtsstrom durch Gabe von 0,1 mM Ouabain vollständig reversibel. Der durch Ouabain gehemmte Strom war wiederum größer in ^{S422D}SGK1-injizierten Oozyten ($32,4 \pm 7,4$ nA; n=5) als in ^{K127N}SGK1-injizierten oder H₂O-injizierten Oozyten ($13,4 \pm 8,0$ nA; n=3 und $13,7 \pm 7,8$ nA; n=4) (Abb. 19).

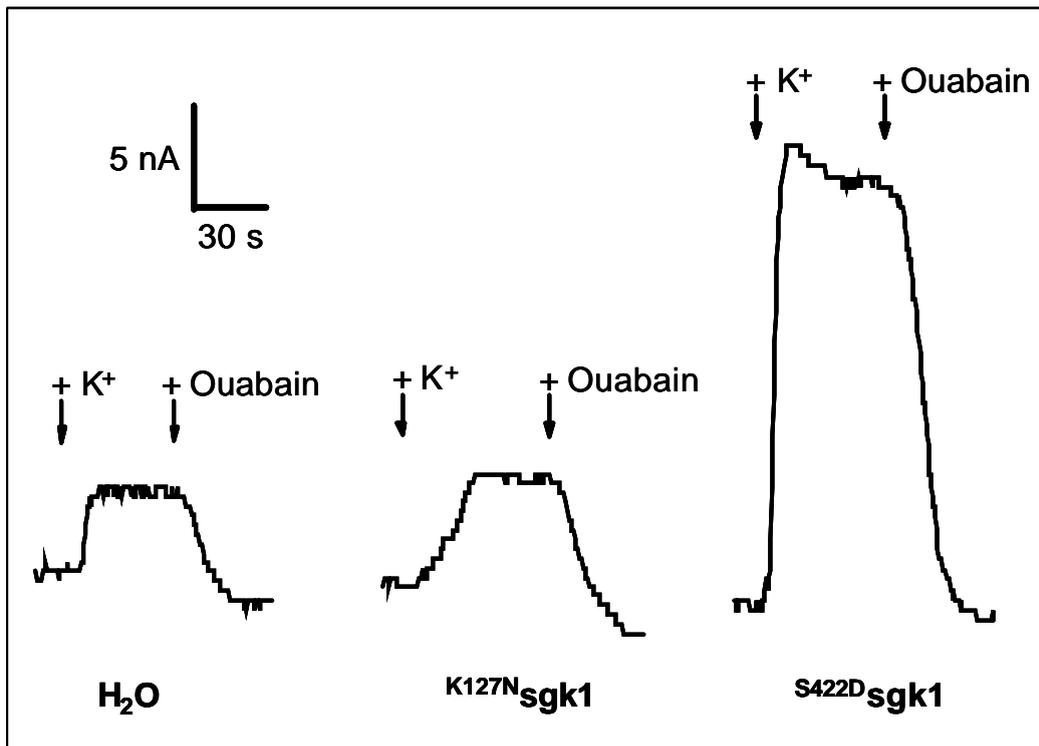


Abb. 19: Originalspuren von H₂O-, ^{K127N}SGK1- und ^{S422D}SGK1 exprimierenden Oozyten in Anwesenheit von BaCl. Gabe von K⁺ und Ouabain ist durch Pfeile markiert.

Mit demselben Messprotokoll wurde auch die Änderung des Membranpotentials sowie die Änderung von intrazellulärer Na⁺_i-Konzentration nach Zugabe von BaCl und KCl gemessen.

Membranpotential und intrazelluläre Na⁺_i-Konzentration

Der Betrag des Ruhemembranpotentials von permanent aktiver Kinase S^{422D}SGK1 exprimierenden Oozyten ($-50 \pm 3,0$ mV; n=13) war zu Beginn der Messung signifikant größer als das von K^{127N}SGK1 exprimierenden Oozyten ($-41,3 \pm 1,9$ mV; n=12).

Gabe von 5 mM BaCl nach 10-minütiger K⁺-freier Inkubation führte in den S^{422D}SGK1 exprimierenden Oozyten mit $30,9 \pm 2,1$ mV (n=13) zu einer nicht signifikant größeren Depolarisation als in K^{127N}SGK1 exprimierenden Kontrollzellen, die eine Depolarisation von $27,5 \pm 1,5$ mV (n=12) zeigten (Abb. 20).

Die auf Gabe von 5 mM KCl eintretende Hyperpolarisation, die wiederum die Aktivität der Na⁺/K⁺-ATPase reflektiert, war in Oozyten mit S^{422D}SGK1 ($-17,6 \pm 2,6$; n=13) wieder signifikant größer als in Oozyten mit K^{127N}SGK1 ($-8,4 \pm 2,7$; n=12) (Abb. 20).

Mit ionenselektiven Elektroden wurde wiederum die intrazelluläre Na⁺_i-Konzentration gemessen, um einen Anstieg des intrazellulären Na⁺_i festzustellen. Wie bereits vermutet, war in der 10-minütigen K⁺-freien Inkubationszeit keine signifikant unterschiedliche Zunahme des intrazellulären Na⁺_i in S^{422D}SGK1 und K^{127N}SGK1 exprimierenden Oozyten festzustellen ($-0,01 \pm 0,07$; n=13 und $-0,05 \pm 0,08$; n=12).

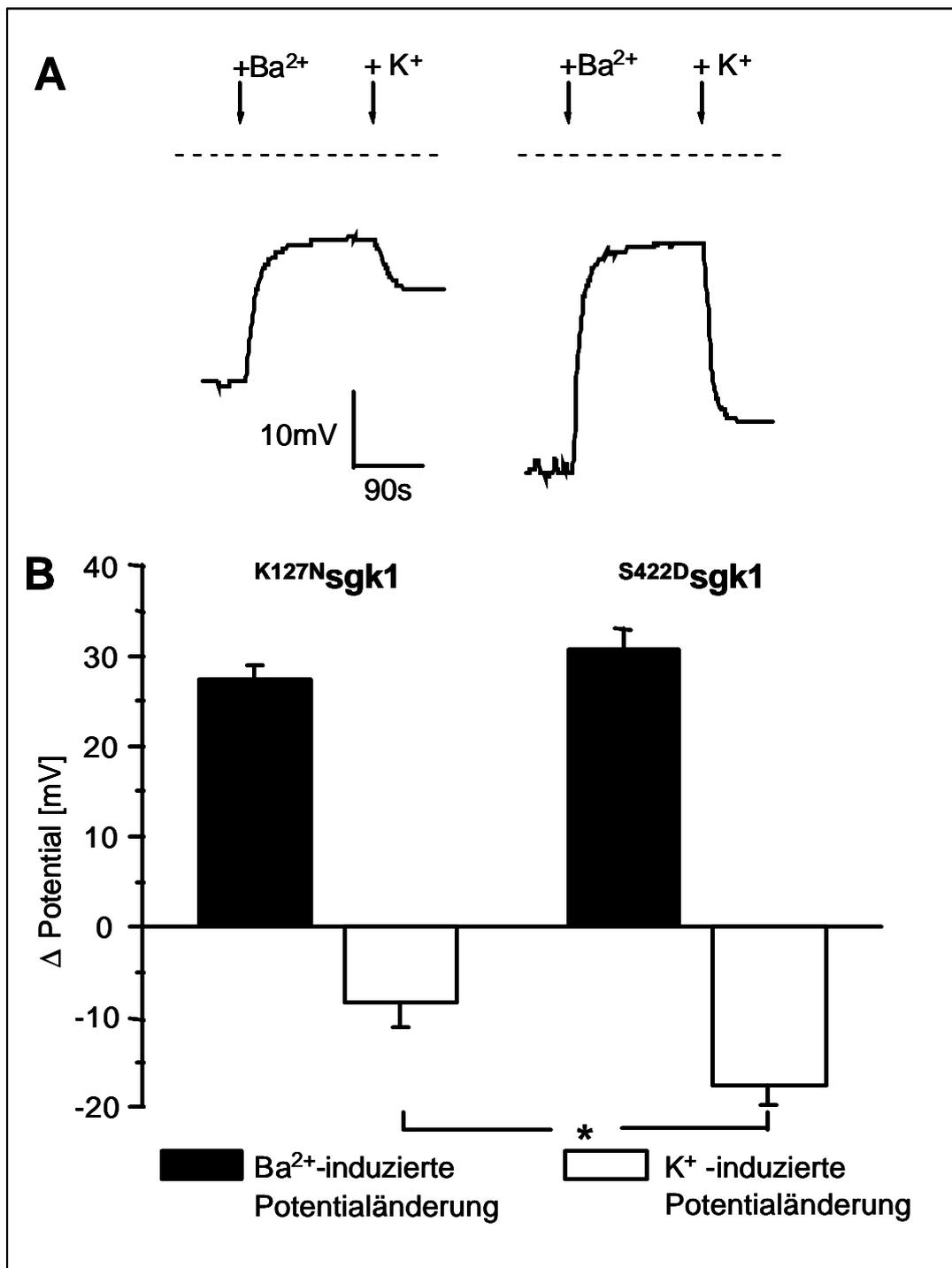


Abb. 20: A. Originalspuren der Potentialmessung von $K^{127N}SGK1$ - und $S^{422D}SGK1$ exprimierenden Oozyten. Gabe von Ba^{2+} und K^+ ist durch Pfeile markiert. B. Durch Ba^{2+} und K^+ induzierte Potentialänderungen von $K^{127N}SGK1$ - und $S^{422D}SGK1$ exprimierenden Oozyten ($n=13$ bzw. $n=12$). Mittelwerte und Standardfehler, * $p < 0.05$.

3.1.4 Isoformen der Serum- und Glucocorticoid-abhängigen Kinase

Nachdem mit der permanent aktiven Mutante ^{S422D}SGK1 und der permanent inaktiven Mutante ^{K127N}SGK1 der Serum- und Glucocorticoid-abhängigen Kinase SGK1 in den vorherigen Versuchen gezeigt werden konnte, dass diese Kinase zu einer Stimulation der endogenen Na⁺/K⁺-ATPase führt, wurde in einer weiteren Versuchsreihe geklärt, ob dies auch für den Wildtyp der SGK1 und die Isoformen SGK2 und SGK3 dieser Kinase zutrifft.

Es wurde wiederum das Messprotokoll mit 10-minütiger K⁺-freier Inkubation, nachfolgender Blockade der K⁺-Leitfähigkeit durch BaCl und Zugabe von 5mM KCl angewandt. Zur Kontrolle der vorher erzielten Ergebnisse und damit ein Vergleich der jeweiligen Stimulationsstärke möglich ist, wurde auch bei dieser Versuchsreihe die permanent aktive Mutante der SGK1 als positive Kontrolle, sowie Wasser als negative Kontrolle in die Oozyten injiziert. Es ergaben sich also folgende Gruppen: Wasser, ^{S422D}SGK1, SGK1, SGK2, SGK3.

Es konnte in dieser Versuchreihe die Stimulation der Na⁺/K⁺-ATPase, repräsentiert durch den Ouabain-sensitiven Auswärtsstrom nach K⁺-Gabe, durch die permanent aktive ^{S422D}SGK1 erneut gezeigt werden.

Zusätzlich haben aber auch die Wildtypen von SGK1, SGK2 einen signifikant stimulierenden Effekt. Dieser ist mit mehr als 3-facher Stimulation natürlich am deutlichsten bei der ^{S422D}SGK1. Wildtyp SGK1 und SGK2 zeigen eine 2-fache Stimulation. Die SGK3 zeigt einen K⁺-induzierten Strom, der 1,5-fach im Vergleich mit der Wasser-Kontrolle ist. Im Dunnetts-Test ist dieser Unterschied allerdings nicht signifikant. Mit Blockade durch Ouabain ließ sich aber auch für diese Gruppe ein signifikanter Unterschied zeigen. Dieser Strom ist einheitlicher und aussagekräftiger, da Ouabain direkt die Na⁺/K⁺-ATPase blockiert. Auf erneute Messung der intrazellulären Na⁺_i-Konzentration wurde verzichtet, da in den Untersuchungen für die SGK1 gezeigt worden war, dass die Na⁺_i-Konzentrationen durch 10-minütige K⁺-freier Inkubation nicht signifikant verändert werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 21 und Tab. 8 zusammengefasst.

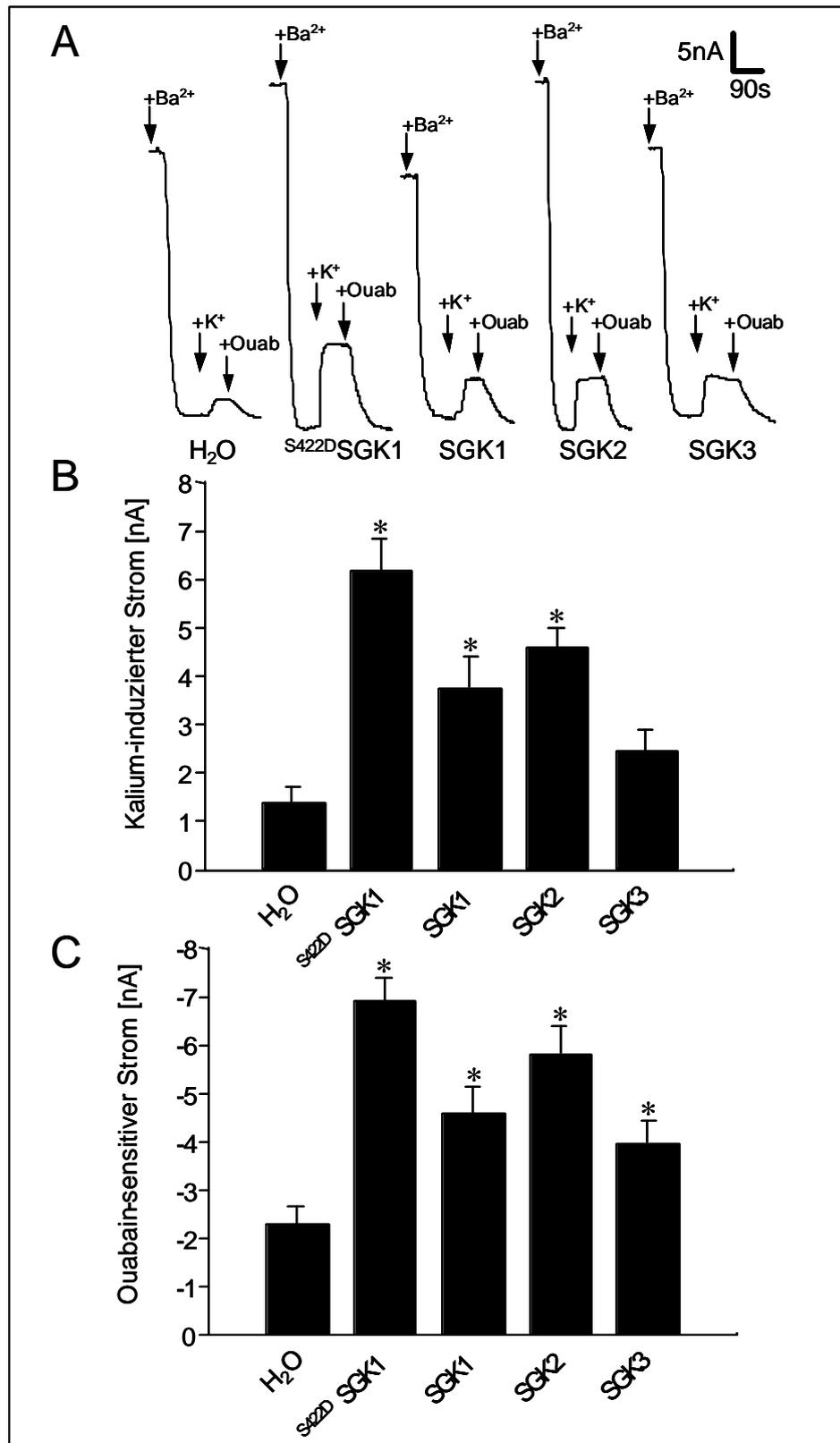


Abb. 21: A. Originalspuren von H₂O-, S^{422D}SGK1-, SGK1-, SGK2- und SGK3-exprimierenden Zellen. B. Auswärtsstrom nach Gabe von 5mM KCl und C. Ouabain-sensitiver Strom von H₂O-, S^{422D}SGK1-, SGK1-, SGK2- und SGK3-exprimierenden Zellen (n=19, n=23, n=10, n=28 bzw. n=18). Mittelwerte und Standardfehler, * p<0.05 gegenüber H₂O.

	V _m [mV]		I _{-30mV} [nA]		?I _{Ba} [nA]		I _p [nA]		?I _{ouabain} [nA]	
H ₂ O	-38.3 ± 1.6	n=13	15.9 ± 2.6	n=19	40.4 ± 4.3	n=19	1.4 ± 0.3	n=19	2.2 ± 0.4	n=19
^{S422D} SGK1	-46.3* ± 1.3	n=16	28.4* ± 3.3	n=23	50.5 ± 4.3	n=23	6.2* ± 0.7	n=23	6.9* ± 0.5	n=23
sgk1	-43.0 ± 1.3	n=11	19.2 ± 2.2	n=10	37.3 ± 5.6	n=10	3.8* ± 0.6	n=10	4.6* ± 0.6	n=10
sgk2	-45.2* ± 1.2	n=20	24.1 ± 2.5	n=28	43.3 ± 3.5	n=28	4.6* ± 0.4	n=28	5.8* ± 0.6	n=28
sgk3	-44.7* ± 1.3	n=16	23.8 ± 2.4	n=18	45.6 ± 3.2	n=18	2.4 ± 0.4	n=18	4.0* ± 0.5	n=18

Tab. 8: Ruhemembranpotential V_m, Haltestrom I_{-30mV} bei einem Haltepotential von -30 mV im „voltage-clamp“ Modus, Ba²⁺-sensitiver Strom I_{Ba}, auswärtsgerichteter Pumpstrom der Na⁺/K⁺-ATPase I_p und Ouabain-sensitiver Strom der Na⁺/K⁺-ATPase I_{Ouabain}. Mittelwerte ± Standardfehler, * p<0.05 zu H₂O.

3.1.5 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Na⁺/K⁺-ATPase

Es konnte gezeigt werden, dass alle Isoformen der Serum- und Glucocorticoid-abhängigen Kinase eine Stimulation der endogenen Na⁺/K⁺-ATPase von *Xenopus laevis* Oozyten bewirken. Diese Stimulation ließ sich elektrophysiologisch durch eine deutliche Steigerung des K⁺-induzierten und Ouabain-sensitiven Pumpstromes der Na⁺/K⁺-ATPase bei einem Haltepotential von -30 mV, sowie durch eine Zunahme der durch K⁺-induzierten Hyperpolarisation des Membranpotentials zeigen. Da dieses unter Blockade der K⁺-Kanäle der Oozyten gemessen wurde, können Strom und Hyperpolarisation nicht durch Veränderungen der K⁺-Leitfähigkeit der Oozyten verursacht sein.

Auch eine höhere intrazelluläre Na⁺_i-Konzentration als indirekte Ursache für den erhöhten Pumpstrom in SGK exprimierenden Oozyten konnte durch direkte Messung der intrazellulären Na⁺_i-Aktivität mit ionensensitiven Elektroden ausgeschlossen werden. ^{S422D}SGK exprimierende Oozyten hatten im Gegenteil eine niedrigere intrazelluläre Na⁺_i-Konzentration aufgrund der erhöhten Na⁺/K⁺-ATPase Aktivität.

3.2 ROMK1

Der *Renal Outer Medullary K⁺*-channel (ROMK1) kommt wie oben beschrieben im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife, im distalen Tubulus und im Sammelrohr des Nierenepithels vor. Er übernimmt dort neben dem epithelialen Na⁺-Kanal (ENaC) und der Na⁺/K⁺-ATPase wichtige Funktionen bei der Na⁺-Resorption und K⁺-Ausscheidung.

Wir wollten feststellen, ob er wie auch ENaC und Na⁺/K⁺-ATPase durch die Serum- und Glucocorticoid-abhängige Kinase SGK reguliert wird. Um dies zu testen, führten wir Koexpressionsstudien von SGK und ROMK in *Xenopus* Oozyten durch.

3.2.1 Koexpression von ROMK1, SGK1 und NHERF2

Injektion von 200ng/μl cRNA von ROMK1 führte in den Oozyten zu einer deutlichen Hyperpolarisation. Diese war in sowohl in Zellen zu finden, die ROMK1 alleine exprimierten als auch in Zellen, die ROMK1 zusammen mit der permanent aktiven Kinase ^{S422D}SGK1 exprimierten. Im „voltage clamp“ Modus wurden die Oozyten dann bei einem Haltepotential von -80 mV in der Nähe des K⁺-Gleichgewichtspotentials geklemmt.

Nach einem Spannungssprung auf -20 mV zeigten die mit ROMK1 allein injizierten Oozyten einen Auswärtsstrom von $7,3 \pm 0,4 \mu\text{A}$ (n=36). Dieser Strom war durch Gabe von Ba²⁺ komplett blockiert. Bei Koexpression von ^{S422D}SGK1 und ROMK1 zeigte sich ein nicht signifikant unterschiedlicher Strom von $7,0 \pm 0,4 \mu\text{A}$ (n=35) (Abb. 22).

Wie in Kap. 4.2 diskutiert kam NHERF2 als Vermittler der SGK-Wirkung in Frage. Oozyten, die ROMK1 und NHERF2 zusammen exprimierten, zeigten wiederum einen Ba²⁺-inhibierbaren Strom von $8,2 \pm 0,3 \mu\text{A}$ (n=27), der nicht signifikant unterschiedlich von dem in ROMK1 oder ROMK1 zusammen mit ^{S422D}SGK1 exprimierenden Oozyten war (Abb. 22).

Die Koexpression von ROMK1 mit ^{S422D}SGK1 und NHERF2 zusammen führte allerdings zu einer deutlichen Steigerung des Stromes auf $17,5 \pm 1,3 \mu\text{A}$ (n=21), und damit zu einer Stimulation des ROMK1 in diesen Zellen (Abb. 22).

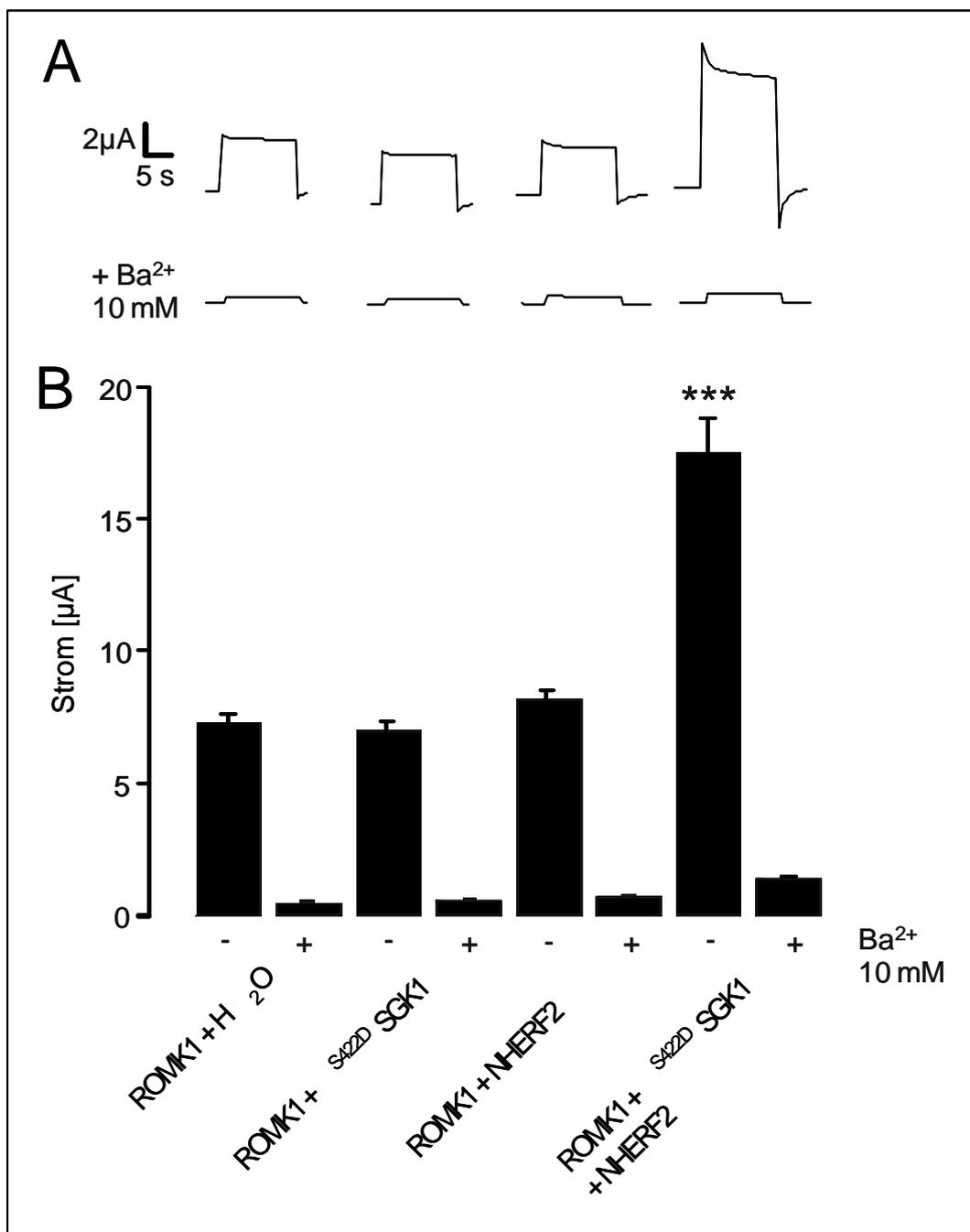


Abb. 22: A. Originalspuren des Auswärtsstroms durch einen Spannungssprung auf -20mV von einem Haltepotential von -80mV in Oozyten, die mit ROMK1 und H₂O, ROMK1 und S^{422D}SGK1, ROMK1 und NHERF2 oder ROMK1 und S^{422D}SGK1 und NHERF2 zusammen injiziert sind.

B. Mittelwerte und Standardfehler der oben genannten Gruppen (n=36, n=35, n=27 bzw. n=21). *** p<0.001 bei Vergleich aller Gruppen (Tukey-Kramer-Test). Zugabe von 10 mM Ba²⁺ in die Messkammer hemmt den Strom komplett.

In Oozyten, die nicht mit ROMK1 injiziert waren, war der K^+ -Strom mit $0,05 \pm 0,01 \mu A$ ($n=6$) vernachlässigbar. Er wurde auch nicht erhöht durch Koexpression mit $S^{422D}SGK1$ ($0,06 \pm 0,01 \mu A$; $n=6$), NHERF2 ($0,05 \pm 0,01 \mu A$; $n=6$) oder beidem zusammen ($0,06 \pm 0,01 \mu A$; $n=6$).

Durch Koexpression der inaktiven Mutante der Serum- und Glucocorticoid-abhängigen Kinase $K^{127N}SGK1$ zusammen mit NHERF2 konnte keine Wirkung auf den ROMK1 erzielt werden. In Abb. 23 sind die durch 10 mM Ba^{2+} blockierbaren Ströme von Oozyten dargestellt, die ROMK1 allein ($8,1 \pm 0,6 \mu A$; $n=16$), ROMK1 zusammen mit $S^{422D}SGK1$ ($6,6 \pm 0,6 \mu A$; $n=15$), zusammen mit $K^{127N}SGK1$ ($8,0 \pm 0,6 \mu A$; $n=17$) und zusammen mit NHERF2 ($8,4 \pm 0,4 \mu A$; $n=12$) sowie ROMK1 zusammen mit NHERF2 und $K^{127N}SGK1$ ($9,3 \pm 0,7 \mu A$; $n=14$) und zusammen mit NHERF2 und $S^{422D}SGK1$ ($18,5 \pm 1,4 \mu A$; $n=14$) exprimieren. Der durch Ba^{2+} inhibierbare Strom repräsentiert den Strom durch ROMK1, da ROMK1 von Ba^{2+} blockiert wird und die endogene K^+ -Leitfähigkeit in den Oozyten deutlich unter der durch Expression von ROMK1 induzierten K^+ -Leitfähigkeit liegt.

Da ROMK1 eine deutliche pH-Sensitivität aufweist könnte die Stimulation des ROMK1 Stromes in $S^{422D}SGK$ und NHERF2 koexprimierenden Oozyten theoretisch auch durch Änderungen des intrazellulären pH_i -Wertes in diesen Zellen verursacht sein. Durch Messungen des intrazellulären pH_i mit ionensensitiven Mikroelektroden konnte dieses aber ausgeschlossen werden. Die intrazellulären pH_i -Werte erreichten in ROMK1 exprimierenden Zellen $7,11 \pm 0,02$ ($n=5$) und in ROMK1 zusammen mit $S^{422D}SGK1$ und NHERF2 exprimierenden Zellen $7,11 \pm 0,04$ ($n=5$).

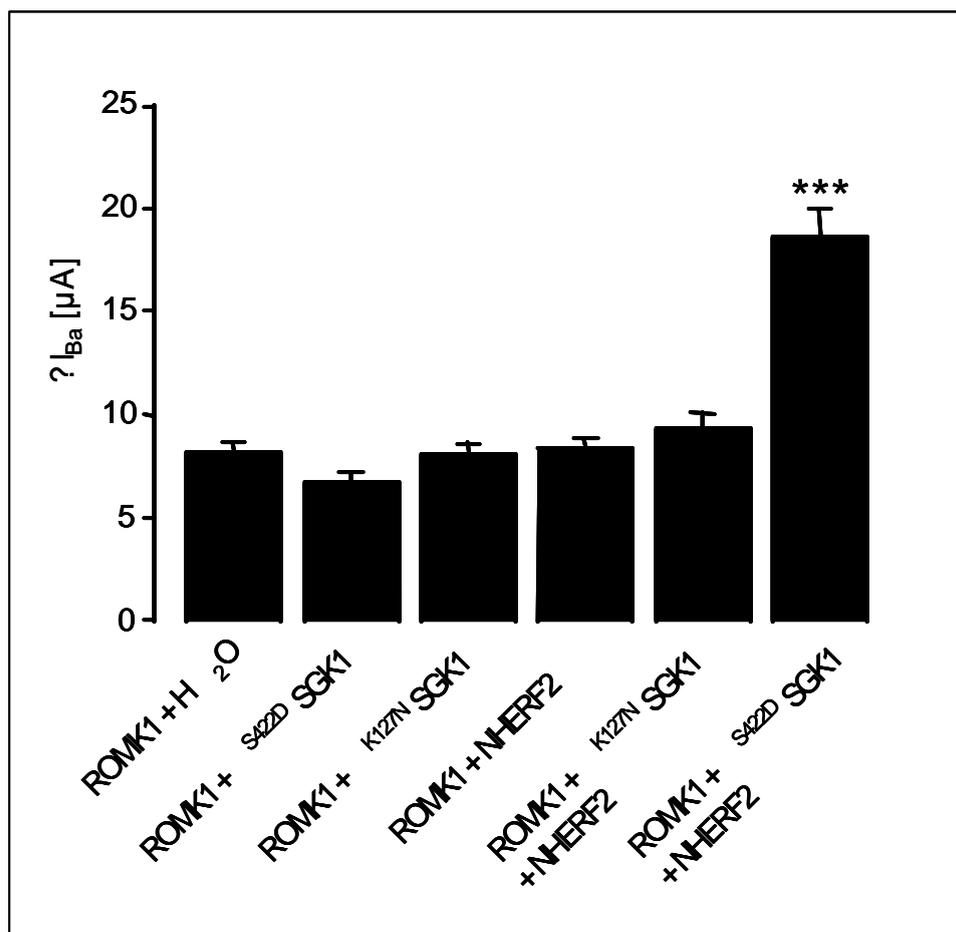


Abb. 23: Ba²⁺-inhibierbarer Strom in Zellen, die ROMK1 allein (n=16), ROMK1 mit aktiver Mutante S^{422D}SGK1 (n=15), inaktiver Mutante K^{127N}SGK1 (n=17) und NHERF2 (n=12) sowie ROMK1 zusammen mit NHERF und inaktiver (n=14) bzw. aktiver Mutante (n=14) der SGK1 exprimieren. Mittelwerte und Standardfehler, ***p<0.001 gegenüber ROMK1 allein exprimierenden Zellen.

3.2.2 Strom-Spannungs-Diagramm und Gating des ROMK

Das Umkehrpotential ist dasjenige Potential, bei dem kein Strom über die Membran fließt. Wenn die Leitfähigkeit nur von beispielsweise K⁺ getragen wird, sollte sich das Umkehrpotential nach der Nernst'schen Gleichung bei einer Erhöhung der extrazellulären K⁺-Konzentration von 2 mM auf 20 mM deutlich nach rechts verschieben.

Die Verschiebung des Umkehrpotentials bei veränderter extrazellulärer K⁺-Konzentration wurde ermittelt, um zu zeigen, dass es sich bei dem regulierten

Strom um einen von K^+ getragenen Strom handelt. Außerdem sollten untersucht werden, ob sich die Öffnungseigenschaften des Kanals in Abhängigkeit von dem Membranpotential durch die Stimulation verändert. Hierzu wurde die Abhängigkeit des Stromes von dem geklemmten Membranpotential bei 2 mM und 20 mM extrazellulärer K^+ -Konzentration gemessen und als Strom-Spannungs-Diagramm (I/V-Diagramm) aufgezeichnet. Wie Abb. 24 zeigt, war eine deutliche Verschiebung des Umkehrpotentials sowohl bei den Oozyten zu sehen, die ROMK1 allein exprimierten ($44,4 \pm 2,6$ mV; $n=12$), als auch bei den Oozyten, die ROMK1 zusammen mit NHERF2 und S^{422D} SGK1 exprimierten ($42,2 \pm 1,9$ mV; $n=12$).

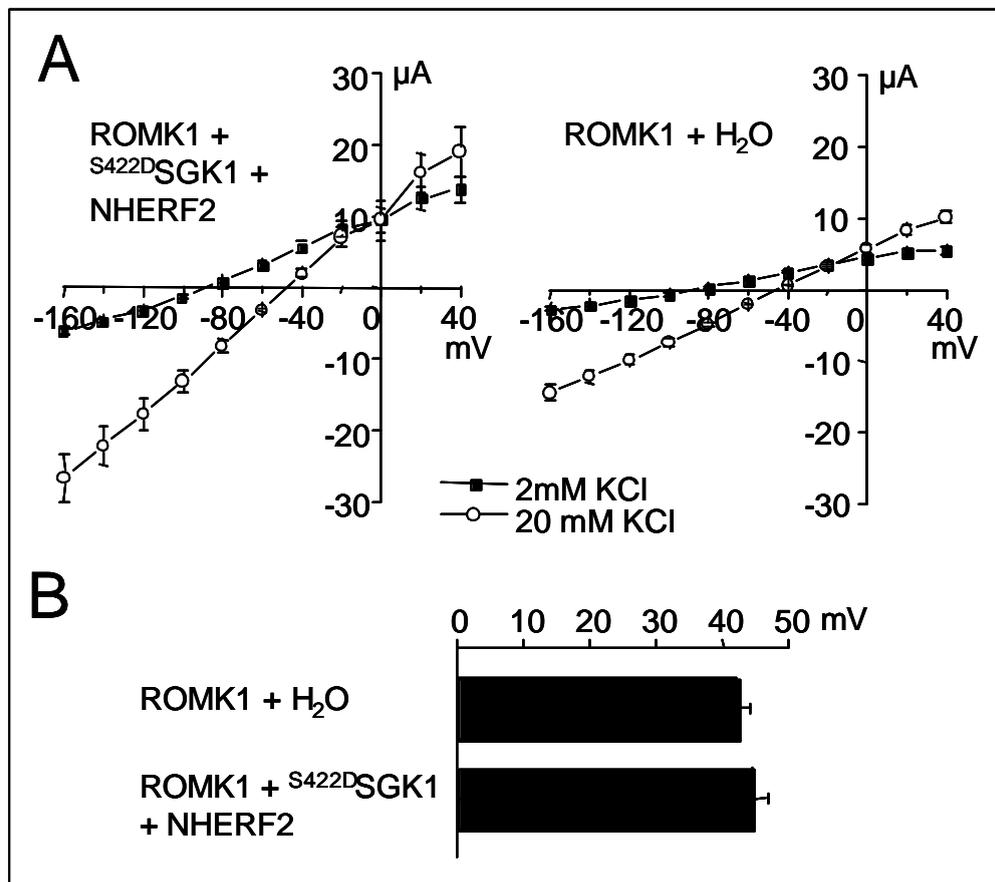


Abb. 24: A. I/V-Diagramme von Oozyten, die mit ROMK1 mit H₂O und die mit ROMK1 zusammen mit S^{422D} SGK1 und NHERF2 injiziert sind für 2 mM KCl (schwarze Kästen) und 20 mM KCl (weiße Kreise) in der Badlösung. B. Verschiebung des Umkehrpotentials in beiden Gruppen.

Da kein signifikanter Unterschied bei der Verschiebung des Umkehrpotentials deutlich wurde, muss davon ausgegangen werden, dass bereits bei alleiniger heterologer Expression des ROMK1 die Leitfähigkeit fast vollständig von diesem Kanal getragen wird.

3.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse zum ROMK1

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Serum- und Glucocorticoid-abhängige Kinase SGK1 auch bei der Regulation des ROMK1 entscheidend beteiligt ist. Beim ROMK wirkt aber nicht die SGK allein stimulierend. Es ist vielmehr die zusätzliche Expression eines weiteren Regulatorproteins nötig. Dabei handelt es sich um NHERF2, das mit SGK und ROMK in den Hauptzellen des distalen Tubulus und des Sammelrohres kolocalisiert ist. Die Expression von nur SGK1 oder nur NHERF2 allein mit dem K⁺-Kanal ROMK1 in *Xenopus* Oozyten führte zu keiner Stimulation des messbaren Stromes. Erst die gleichzeitige Expression von ROMK1 mit SGK und NHERF2 führte zu einer deutlichen Stimulation. Dieser Strom ist ein von K⁺ getragener Strom durch den heterolog exprimierten ROMK1, was durch Verschiebung des Umkehrpotentials bei Änderung der extrazellulären K⁺-Konzentration, durch Blockade mit dem K⁺-Kanalblocker Ba²⁺ sowie durch die typische Einwärtsrektifizierung konnte gezeigt werden konnte.

3.3 Kv1.3

Für den K⁺-Kanal Kv1.3 gab es bereits deutliche Hinweise darauf, dass er durch die Serum- und Glucocorticoid-abhängige Kinase SGK reguliert wird [83]. Über den genauen Mechanismus war allerdings noch nichts bekannt.

3.3.1 Regulation durch die permanent aktive ^{S422D}SGK1

Um die Regulation auch des Kv1.3 durch die SGK in Oozyten nachzuweisen, injizierten wir Kv1.3 zusammen mit H₂O, permanent aktiver ^{S422D}SGK1 oder permanent inaktiver ^{K127N}SGK1 in üblicher Konzentration.

Die Zellen wurden im „voltage clamp“ Modus auf einem Membranpotential von -80 mV gehalten und es wurden Spannungspulse auf -60, -40, -20, -10, 0, +20 und +40 mV für jeweils 5 s mit einer Pause von 40 s zwischen den Pulsen appliziert. Ab einer Spannung positiver als -40 mV wurde der Kv1.3 aktiviert und zeigte bei zunehmend positiven Spannungen die typische schnelle Aktivierung und langsame Inaktivierung (Abb. 25).

Die Spitzenströme waren signifikant größer in den Oozyten, die mit Kv1.3 und ^{S422D}SGK1 koinjiziert waren ($10,3 \pm 0,5 \mu\text{A}$; n=8; bei Puls auf +20 mV) gegenüber den mit H₂O ($2,0 \pm 0,5 \mu\text{A}$; n=6; bei Puls auf +20 mV) oder ^{K127N}SGK1 ($2,3 \pm 0,3 \mu\text{A}$; n=8; bei Puls auf +20 mV) koinjizierten Zellen (Abb. 25A). Ohne Injektion von Kv1.3 war kein typischer langsam inaktivierender Strom zu sehen ($0,3 \pm 0,03 \mu\text{A}$; n=3; bei Puls auf +20 mV).

Bereits bei dem Spannungspuls auf -20 mV findet sich eine deutliche Aktivierung durch die SGK1, wie es im Strom-Spannungs-Diagramm ersichtlich wird (Abb. 25B).

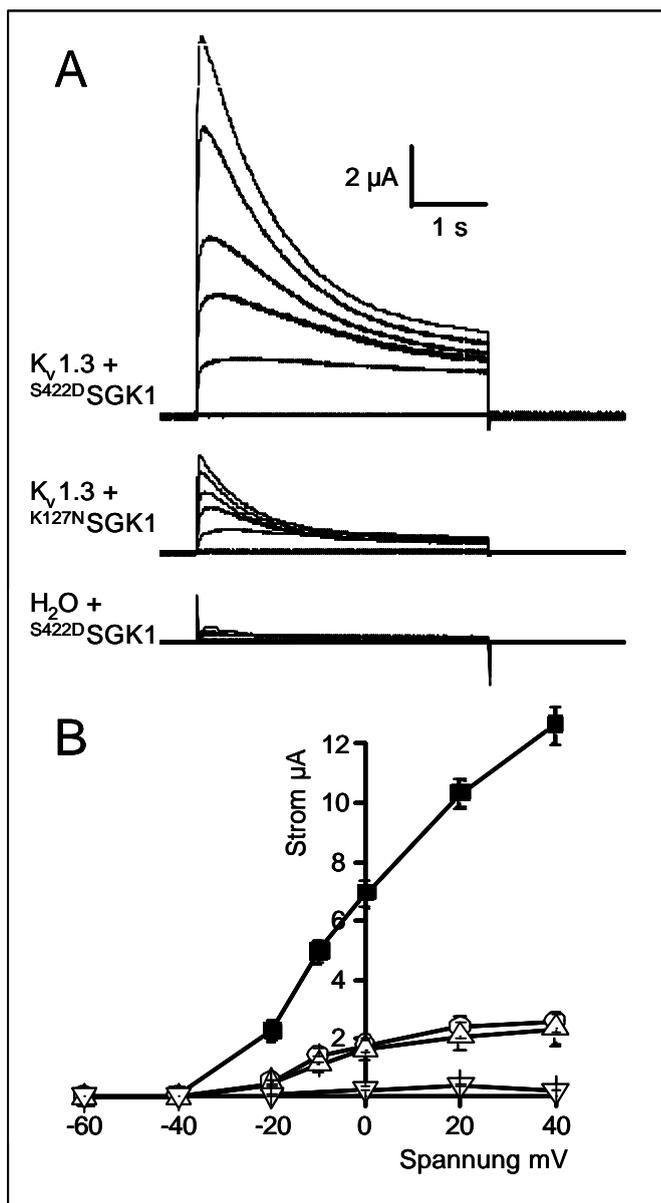


Abb. 25: A. Originalspuren nach Spannungssprung auf -60 , -40 , -20 , -10 , 0 , $+20$, $+40$ mV von -80 mV Haltepotential von Oozyten, die $K_v1.3$ zusammen mit $S422D$ SGK1 oder $K127N$ SGK1 oder $S422D$ SGK1 allein exprimieren.
 B. IV-Diagramm der Spitzenströme in Oozyten, die $K_v1.3$ zusammen mit $S422D$ SGK1 (schwarze Quadrate), $K127N$ SGK1 (Dreiecke mit Spitze nach oben) oder H_2O (helle Kreise) oder $S422D$ SGK1 allein (Dreiecke mit Spitze nach unten) exprimieren.

Dass es sich hierbei um einen Strom handelt, der von $K_v1.3$ getragen wird, konnte durch vollständige Blockade des spannungsaktivierten Stromes mit Magatoxin, einem spezifischen Blocker von $K_v1.3$ gezeigt werden (Abb. 26).

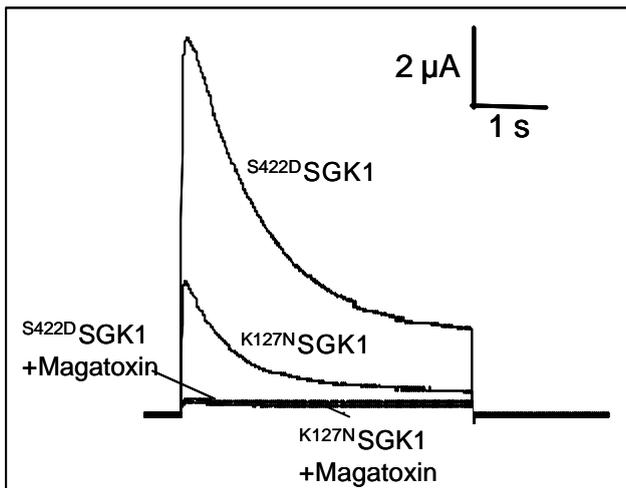


Abb. 26: Blockade mit Magatoxin in Oozyten, die $K_v1.3$ zusammen mit S^{422D} SGK1 und S^{422D} SGK1 exprimieren.

3.3.2 Aktivierung des $K_v1.3$ durch die Isoformen der SGK

Wie bei der Na^+/K^+ -ATPase sollte für den $K_v1.3$ weiterhin gezeigt werden, ob auch die anderen Isoformen der Serum- und Glucocorticoid-abhängigen Kinase SGK die Aktivität des K^+ -Kanals $K_v1.3$ regulieren. Außerdem sollte der Zeitverlauf der Aktivierung bestimmt werden.

Dazu wurden $K_v1.3$ zusammen mit jeweils 7,5 ng/Oozyte cRNA von SGK1, SGK2 oder SGK3 injiziert und die Spitzenströme nach einem Spannungspuls auf +20 mV von -80 mV am ersten, zweiten und vierten Tag nach Injektion gemessen.

Bereits am ersten Tag war eine leichte Stimulation durch die Kinasen zu sehen. Der deutlichste stimulierende Effekt zeigte sich aber bei allen Isoformen am vierten Tag mit $6,6 \pm 0,8 \mu A$ ($n=21$) bei Koexpression von SGK1, $6,5 \pm 0,9 \mu A$ ($n=21$) bei Koexpression SGK2 und $6,3 \pm 0,9 \mu A$ ($n=21$) bei Koexpression SGK3 gegenüber $2,9 \pm 0,6 \mu A$ ($n=21$) bei Oozyten, die $K_v1.3$ allein exprimierten (Abb. 27).

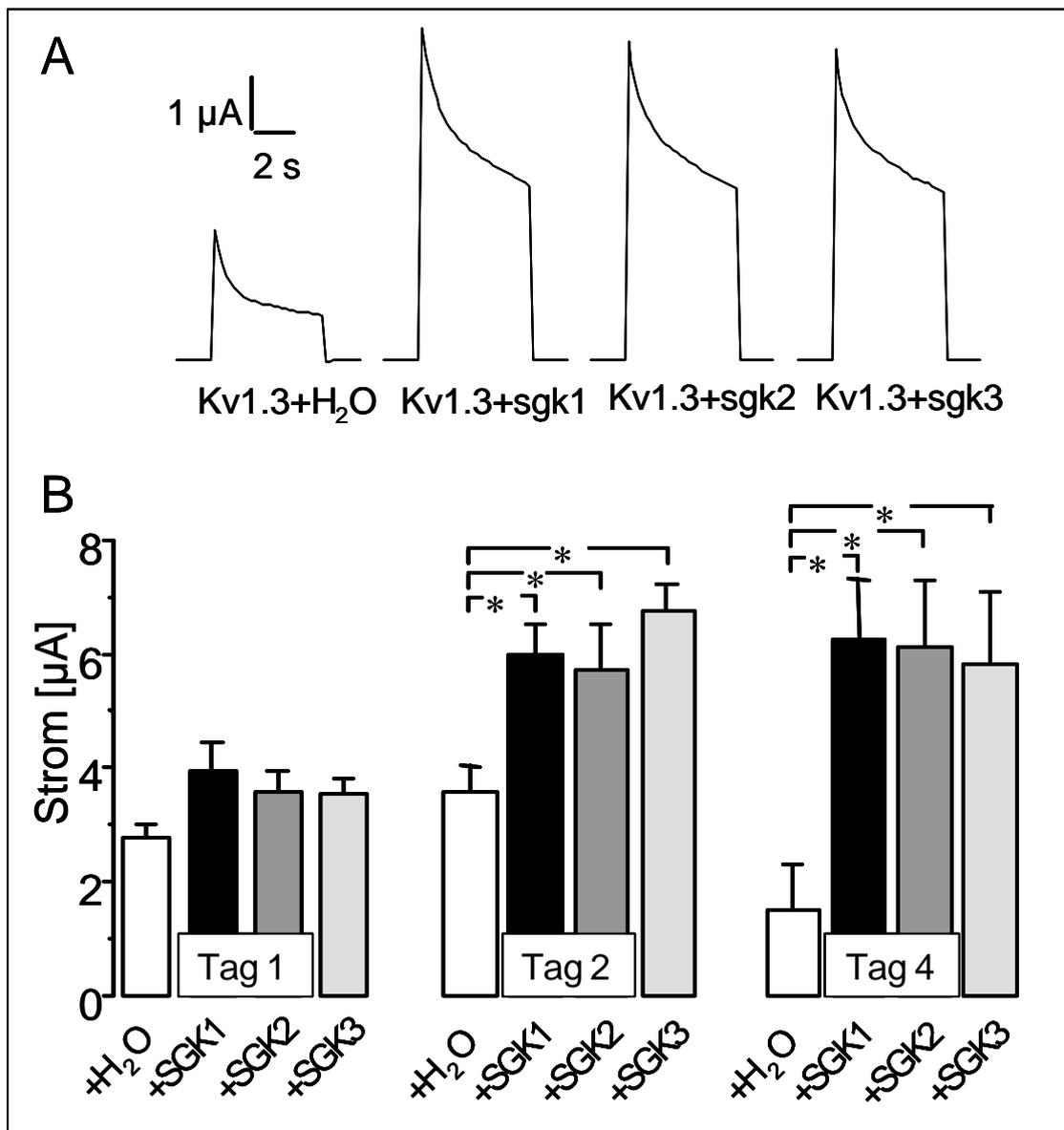


Abb. 27: A. Originalspuren nach einem Spannungssprung auf 20mV von -80 mV Haltepotential In $K_v1.3$ mit H_2O , SGK1, SGK2 oder SGK3 injizierten Oozyten.
B. Mittelwerte und Standardfehler des Stromes in diesen Gruppen am Tag 1,2 und 4 nach Injektion (* $p < 0,05$ gegenüber H_2O).

3.3.3 Stabilisierung des Kv1.3 in der Membran durch SGK

Mit den folgenden Versuchen sollte gezeigt werden, in welcher Art und Weise die SGK eine Hochregulation des K⁺-Kanals Kv1.3 bewirkt.

Prinzipiell sind zwei Möglichkeiten denkbar. Zum einen könnten die biophysikalischen Eigenschaften des jeweiligen Kanals in der Form verändert werden, dass eine größere Leitfähigkeit jedes einzelnen Kanals erreicht wird. Dies könnte beispielsweise durch Änderung der Aktivierungskonstanten, der Inaktivierungskonstanten oder der Aktivierungsspannung geschehen.

Zum andern wäre eine Möglichkeit zur Aktivierung, die Dichte von Kanälen in der Zellmembran zu verändern, um damit durch mehr Kanäle einen größeren Strom zu erzielen. Dies kann wiederum durch verstärkten Kanaleinbau in die Membran oder verminderten Kanalabbau aus der Membran erreicht werden.

Bei der Regulation des ENaC durch die Serum- und Glucocorticoid-abhängige Kinase SGK, konnte gezeigt werden, dass Koexpression von ENaC mit der SGK die Dichte des Na⁺-Kanals in der Zellmembran verändert [231]. Die Vermutung lag also nahe, dass auch der Kv1.3 auf diese Weise von der SGK reguliert werden könnte.

Inkubation mit Brefeldin

Um den Einfluss der SGK auf die Kanaldichte in der Membran zu testen, wurde Kv1.3 mit H₂O, SGK1, SGK2 und SGK3 koinjiziert. Nach 3 Tagen Inkubation wurden die Oozyten mit dem schon vorher benutzten Spannungsprotokoll (Haltepotential -80 mV; Spannungspuls über 5 s auf +20mV) gemessen und der Spitzenstrom ermittelt. Danach wurden die Oozyten einzeln in 5 µM Brefeldin A über ca. 24 h inkubiert. Brefeldin A hemmt die Proteininsertion in die Plasmamembran über eine Blockade des Transports aus dem endoplasmatischen Retikulum, so dass ab dem Zeitpunkt der Inkubation keine neuen Kanalproteine mehr in die Zellmembran eingebaut wurden. Dadurch ist die Größe des Stromes allein abhängig vom Abbau des Kanals aus der Membran.

Inkubation der Oozyten mit Brefeldin A muss also zu einer Erniedrigung des Stromes durch den Kanal führen, da nur noch Membranproteine abgebaut werden. Dieser Abbau müsste in den Oozyten, die Kv1.3 zusammen mit SGK

exprimieren, weniger stark ausgeprägt sein, wenn die SGK den Abbau hemmt. Durch zwei Messungen an jeweils einer Oozyte, eine zum Zeitpunkt t_0 vor Inkubation mit Brefeldin A und eine zum Zeitpunkt t_{24} 24 Stunden nach Inkubation mit Brefeldin A sollte dieses nachgewiesen werden.

Wie schon in den Voruntersuchungen führte die Koexpression von $K_v1.3$ mit der SGK1, der SGK2 und der SGK3 zu einer Stimulation des K^+ -Stromes (Tab. 9, Abb. 28), die allerdings in diesem Experiment nur für die SGK3 das 95%-Signifikanzintervall im Dunnetts-Test erreichte. Trotzdem führte die Inkubation mit Brefeldin A für 24h (Zeitpunkt t_{24}) bei Koexpression mit jeder Isoform jeweils zu einer weitaus schwächeren Reduktion des von $K_v1.3$ getragenen Stromes als in der H_2O Kontrolle (Tab. 9, Abb. 28).

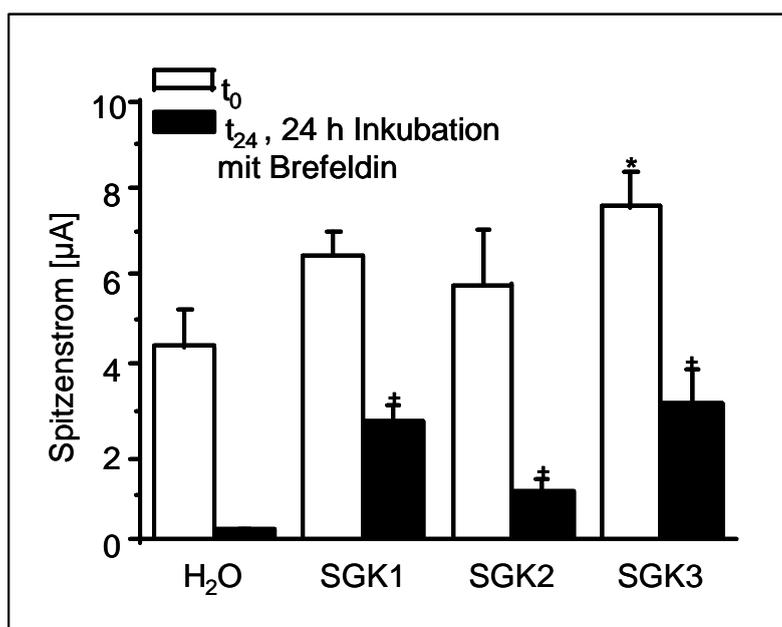


Abb. 28: Spitzenströme vor (weiße Säulen, t_0) und nach 24 Stunden Inkubation mit Brefeldin A (schwarze Säulen, t_{24}) in Oozyten, die $K_v1.3$ allein und zusammen mit SGK1, SGK2 und SGK3 exprimieren. Mittelwerte und Standardfehler ($n=7-9$), * $p<0.05$ gegenüber H_2O Zeitpunkt t_0 , † $p<0.05$ gegenüber H_2O Zeitpunkt t_{24} .

	Peak vor Brefeldin (t_0) [μ A]		Peak nach Brefeldin (t_{24}) [μ A]	
H ₂ O	4.4 ± 0.8	n=7	0.2 ± 0.02	n=7
sgk1	6.5 ± 0.6	n=9	2.7 ± 0.3 *	n=9
sgk2	5.8 ± 1.2	n=9	1.0 ± 0.3 *	n=9
sgk3	7.6 ± 0.8 *	n=9	3.1 ± 0.8 *	n=8

Tab. 9: Spitzenstrom vor und nach Inkubation mit Brefeldin A. Mittelwerte ± Standardfehler, * $p < 0.05$ gegenüber H₂O.

Diese Wirkung war bei der SGK2, die auch die kleinste Stimulation zeigte, am schwächsten ausgeprägt, aber noch signifikant unterschiedlich von Oozyten, die Kv1.3 allein exprimierten.

Im gepaarten Vergleich betrug der Spitzenstrom in den Kv1.3 allein exprimierenden Kontrollzellen nach der Inkubation mit Brefeldin nur noch 5 ± 1 % des Stromes vor der Inkubation, in Kv1.3 und SGK1 exprimierenden Zellen noch 43 ± 6 %, in Kv1.3 und SGK2 exprimierenden Zellen noch 18 ± 4 % und in Kv1.3 und SGK3 exprimierenden Zellen noch 41 ± 9 % (Abb. 29).

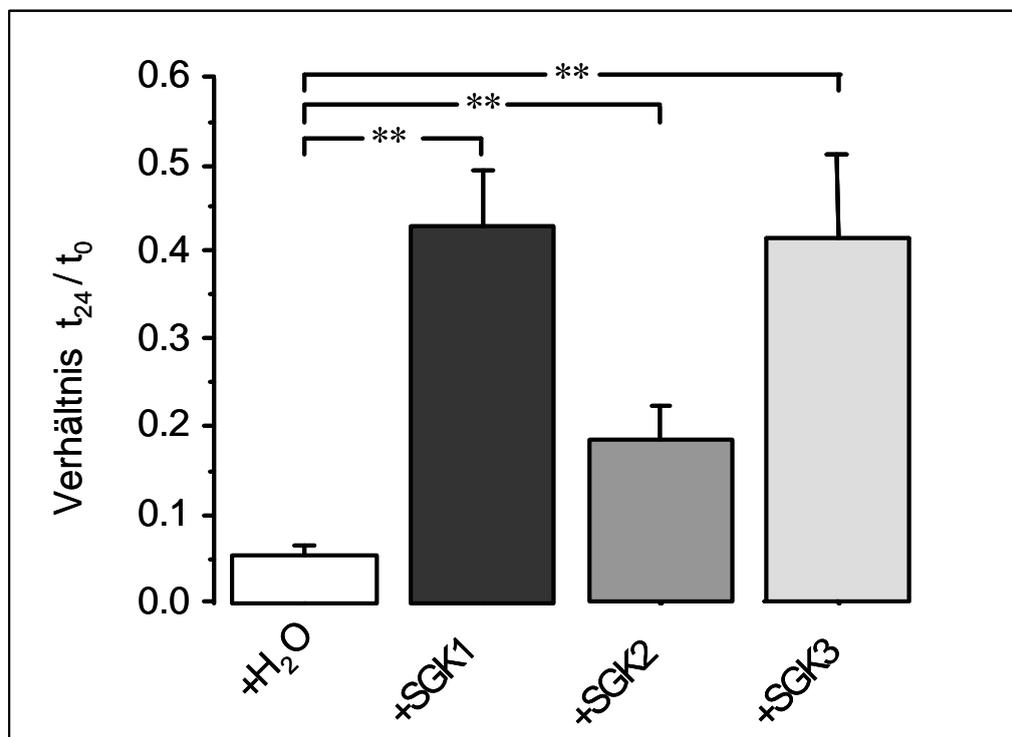


Abb. 29: Verhältnis von Spitzenstrom nach Inkubation mit Brefeldin A zu vor Inkubation mit Brefeldin A. * $p < 0.05$ gegenüber H₂O.

3.3.4 Koexpression von Nedd4-2 mit Kv1.3 und SGK

Durch die Experimente mit Brefeldin A konnte gezeigt werden, dass die Regulation des spannungsgesteuerten K⁺-Kanals Kv1.3 durch die Serum- und Glucocorticoid-abhängige Kinase SGK über die Hemmung des Kanal-Abbaus aus der Membran geschieht. Nedd4-2 ist (siehe Kap. 1.2.3) ein Protein, dass die Dichte von Kanälen und Transportern durch vermehrten Ausbau aus der Membran runterreguliert. Eine Interaktion zwischen Nedd4-2 und SGK ist bekannt [62, 207].

Spitzenströme

Um festzustellen, ob Nedd4-2 auch bei der Regulation des spannungs-abhängigen K⁺-Kanals Kv1.3 eine Rolle spielt, koexprimierten wir zunächst Kv1.3 mit und ohne Nedd4-2.

Nach 3 Tagen wurden die Zellen mit dem vorher beschriebenen Pulsprotokoll (Haltepotential -80 mV; 5 s Spannungspuls auf -60, -40, -20, -10, 0, +20, +40 mV; 40 s Pause zwischen den Pulsen) gemessen. Hier zeigte sich eine deutliche Hemmung des für Kv1.3 typischen Stromes in den Oozyten, die Nedd4-2 mit Kv1.3 koexprimierten, gegenüber den mit Kv1.3 und H₂O injizierten Kontrollzellen (Tab. 10, Abb. 30).

In Oozyten, die alle 3 Proteine, nämlich Kv1.3, permanent aktive Mutante S^{422D}SGK1 und Nedd4-2, zusammen exprimierten war die beobachtete Hemmung wieder aufgehoben (Tab. 10, Abb. 30).

Kv1.3	Peak [μA]		Steady state [μA]	
	Mittelwert	n	Mittelwert	n
+ H ₂ O	4.1 ± 0,3	26	0.8 ± 0,07	26
+ Nedd4-2	0.7 ± 0,05 *	28	0.2 ± 0,02 *	28
+ S ^{422D} SGK1	10.3 ± 0,5 **	29	3.0 ± 0,2 **	29
+ S ^{422D} SGK1 + Nedd4-2	5.8 ± 0,5 **	24	1.2 ± 0,2 *	24

Tab. 10: Spitzenströme und stabile Ströme nach Puls auf +20 mV von -80 mV Haltepotential in Oozyten, die Kv1.3 allein oder zusammen mit Nedd4-2, S^{422D}SGK1 oder S^{422D}SGK1 und Nedd4-2 exprimieren. Mittelwerte ± Standardfehler, * p < 0,05 gegenüber H₂O, † p < 0,05 gegenüber Nedd4-2.

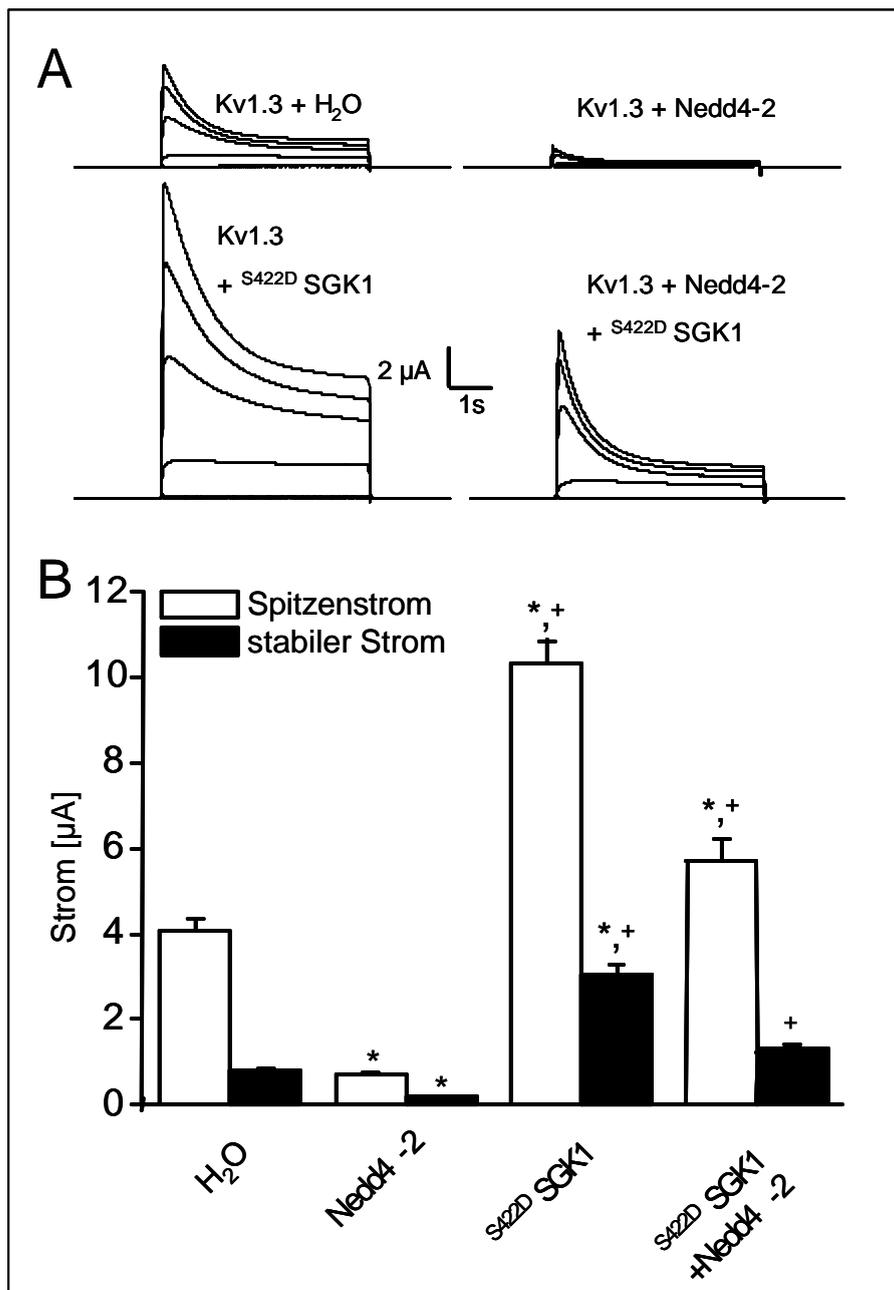


Abb. 30: A. Originalspuren von Oozyten, die K_v1.3 allein oder zusammen mit Nedd4-2, S^{422D}SGK1 oder S^{422D}SGK1 und Nedd4-2 exprimieren. Haltepotential -80 mV; Puls auf -60, -40, -20, 0, +20, +40 mV; 40 s Pause zwischen den Pulsen.

B. Spitzenströme und stabile Ströme von Oozyten, die K_v1.3 allein (n=26) oder zusammen mit Nedd4-2 (n=28), S^{422D}SGK1 (n=29) oder S^{422D}SGK1 und Nedd4-2 (n=24) exprimieren. Puls auf +20 mV. Mittelwerte und Standardfehler, * p<0.05 gegenüber H₂O, + p<0.05 gegenüber Nedd4-2.

Öffnungsverhalten

Der aus den Messungen resultierende Zusammenhang von Membranpotential und Stromstärke zeigt die beginnende Aktivierung des spannungsabhängigen Stromes bei etwa -20 mV im I/V-Diagramm (Abb. 31).

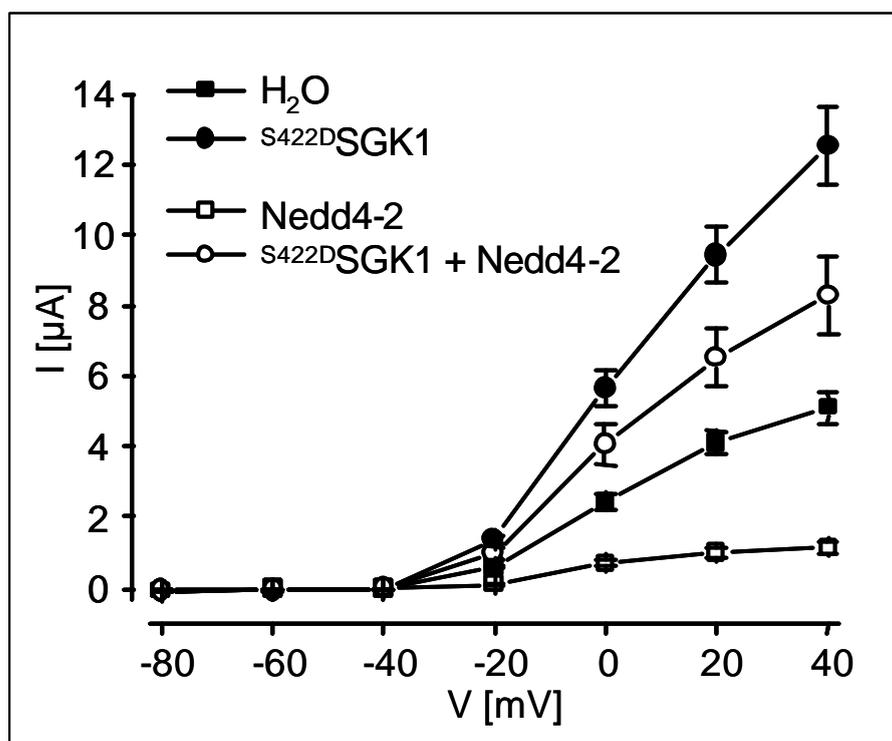


Abb. 31: I/V-Diagramm von Oozyten, die $K_v1.3$ allein ($n=14$) oder zusammen mit Nedd4-2 ($n=14$), $S^{422D}SGK1$ ($n=12$) oder $S^{422D}SGK1$ und Nedd4-2 ($n=12$) exprimieren. Haltepotential -80 mV; Puls auf -60 , -40 , -20 , 0 , $+20$, $+40$ mV.

Die biophysikalischen Eigenschaften des K^+ -Kanals änderten sich durch die Koexpression mit Nedd4-2 oder $S^{422D}SGK1$ nicht wesentlich, wie die Ermittlung von Inaktivierungskonstante τ_{inact} und halbmaximalem Aktivierungspotential $V_{1/2}$ zeigen (Tab. 11, Abb. 32). Eine Erhöhung der Membrandichte geht mit langsamerer Inaktivierung des Kanals einher [105]. Daher muss die leichte Änderung der Inaktivierungskonstante τ_{inact} nicht durch strukturelle Veränderungen des $K_v1.3$ verursacht sein.

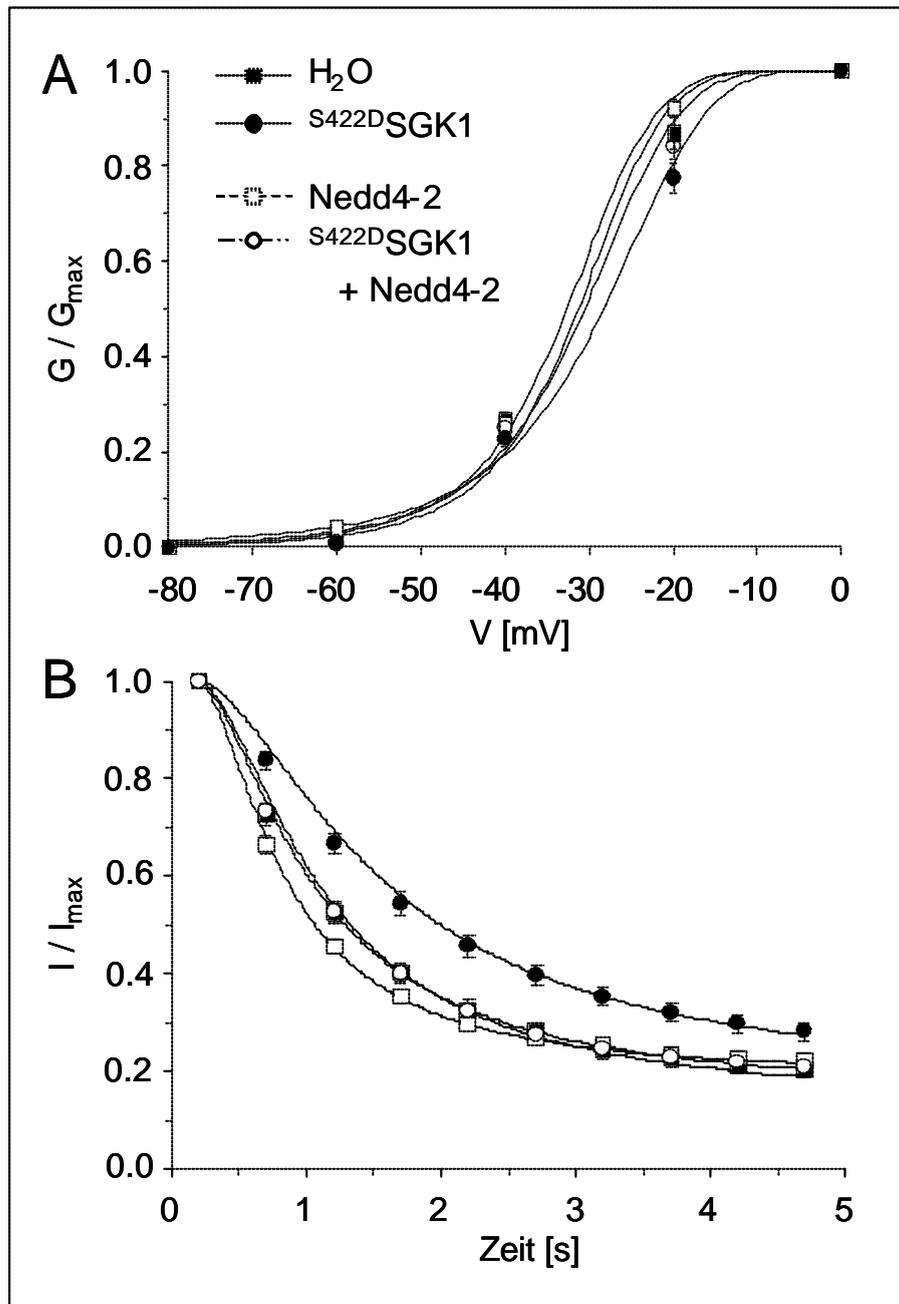


Abb. 32: Eigenschaften des $K_v1.3$ nach Koexpression mit Nedd4-2 und $S422D$ SGK1. A. Leitfähigkeits-Spannungs-Verhältnis zur Ermittlung des halbmaximalen Aktivierungspotentials $V_{1/2}$. B. Zeitabhängige Inaktivierung des Stromes zur Ermittlung der Inaktivierungskonstante t_{inact} .

K _v 1.3 +	t _{inact} [s]		V _{1/2} [mV]	
	H ₂ O	0.94 ± 0.09	n=29	-31.26 ± 1.06
Nedd4-2	0.65 ± 0.03*	n=30	-32.62 ± 0.76	n=14
^{S422D} SGK1	1.40 ± 0.11**	n=29	-28,27 ± 1.14 ⁺	n=12
^{S422D} SGK1+Nedd4-2	0.88 ± 0.04	n=26	-30.51 ± 1.15	n=12

Tab. 11: Inaktivierungskonstante t_{inact} und halbmaximales Aktivierungspotential V_{1/2} des K_v1.3 nach Koexpression mit Nedd4-2 und ^{S422D}SGK1. Mittelwerte und Standardfehler, *p<0.05 zu H₂O, ⁺p<0.05 zu Nedd4-2.

Isoformen der SGK

In einer weiteren Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass auch die anderen Isoformen SGK2 und SGK3 über eine Hemmung des Nedd4-2 Effektes wirken. Hier war mit dem bekannten Pulsprotokoll in den Oozyten, die K_v1.3 allein exprimieren, ein Spitzenstrom von 2,6 ± 0,2 μA (n=15) auslösbar. Dieser war durch Nedd4-2 auf 1,0 ± 0,1 μA (n=13) signifikant reduziert und durch zusätzliche Expression von SGK1 auf 3,7 ± 0,4 μA (n=13), von SGK2 auf 1,9 ± 0,3 μA (n=13) und von SGK3 auf 5,2 ± 0,7 μA (n=9) wieder signifikant erhöht (Abb. 33).

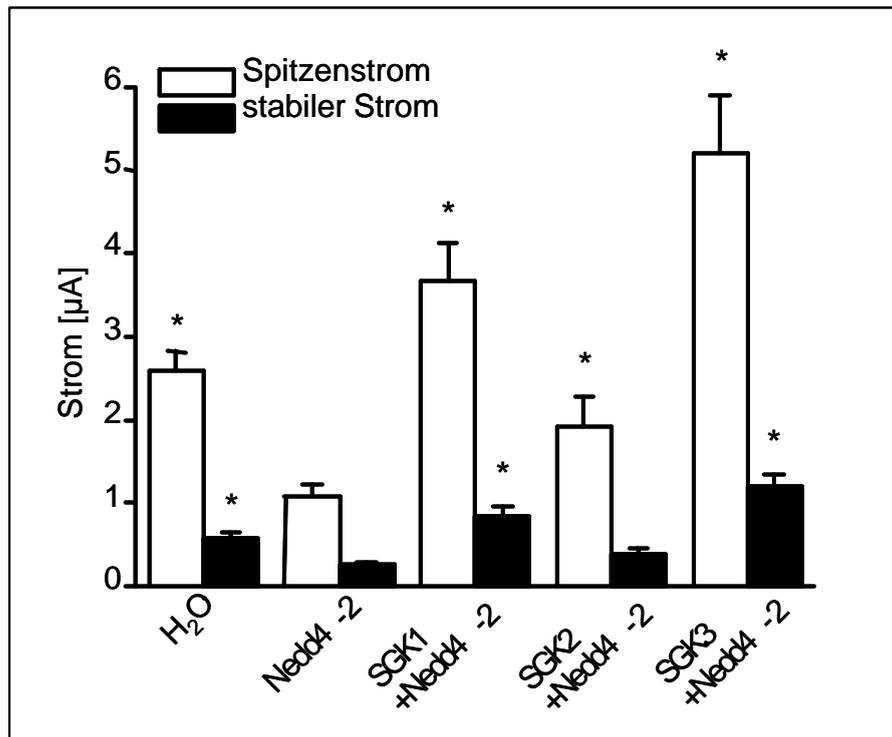


Abb. 33: Spitzenströme und stabile Ströme $K_v1.3$ injizierter Oozyten nach einem Spannungspuls auf +20mV von -80 mV Haltepotential bei Koinjektion von H₂O (n=15), Nedd4-2 (n=13) und Nedd4-2 mit SGK1 (n=13), SGK2 (n=13) und SGK3 (n=9). Mittelwerte und Standardfehler, * p<0.05 gegenüber Nedd4-2.

Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung durch Nedd4-2

Die bisher zur Injektion verwandten cRNA Konzentrationen für $K_v1.3$ (0,125ng/Oozyte) und SGK (7,5ng/Oozyte) sowie Nedd4-2 (5ng/Oozyte) sind sehr unterschiedlich sind. Es könnte daher möglicherweise auch ein unspezifischer Effekt durch Verdrängung der Expression des Proteins mit der niedrigsten Konzentration für die Regulation durch Nedd4-2 verantwortlich sein. Wir untersuchten deshalb die Abhängigkeit des hemmenden Effektes von Nedd4-2 von unterschiedlichen cRNA Konzentrationen dieser Ubiquitinligase. Hierzu wurde $K_v1.3$ und ^{S422D}SGK1 mit den bisher verwandten Konzentrationen (0,125 ng/Oozyte bzw. 7,5 ng/Oozyte) aber variiertes cRNA Konzentration für Nedd4-2 (0,075 / 0,25 / 0,75 / 2,5 / 7,5 ng/Oozyte) injiziert. Bereits bei einer cRNA Konzentration von 0,25 ng/Oozyte Nedd4-2 war eine deutliche Hemmung

des Spitzenstromes von $3,8 \pm 0,5 \mu\text{A}$ ($n=14$) ohne Nedd4-2 auf $1,7 \pm 0,3 \mu\text{A}$ ($n=14$) zu sehen. Diese wurde bei den niedrigen Konzentrationen deutlich durch die S^{422D} SGK1 ($7,0 \pm 0,9 \mu\text{A}$; $n=8$) aufgehoben (Abb. 34).

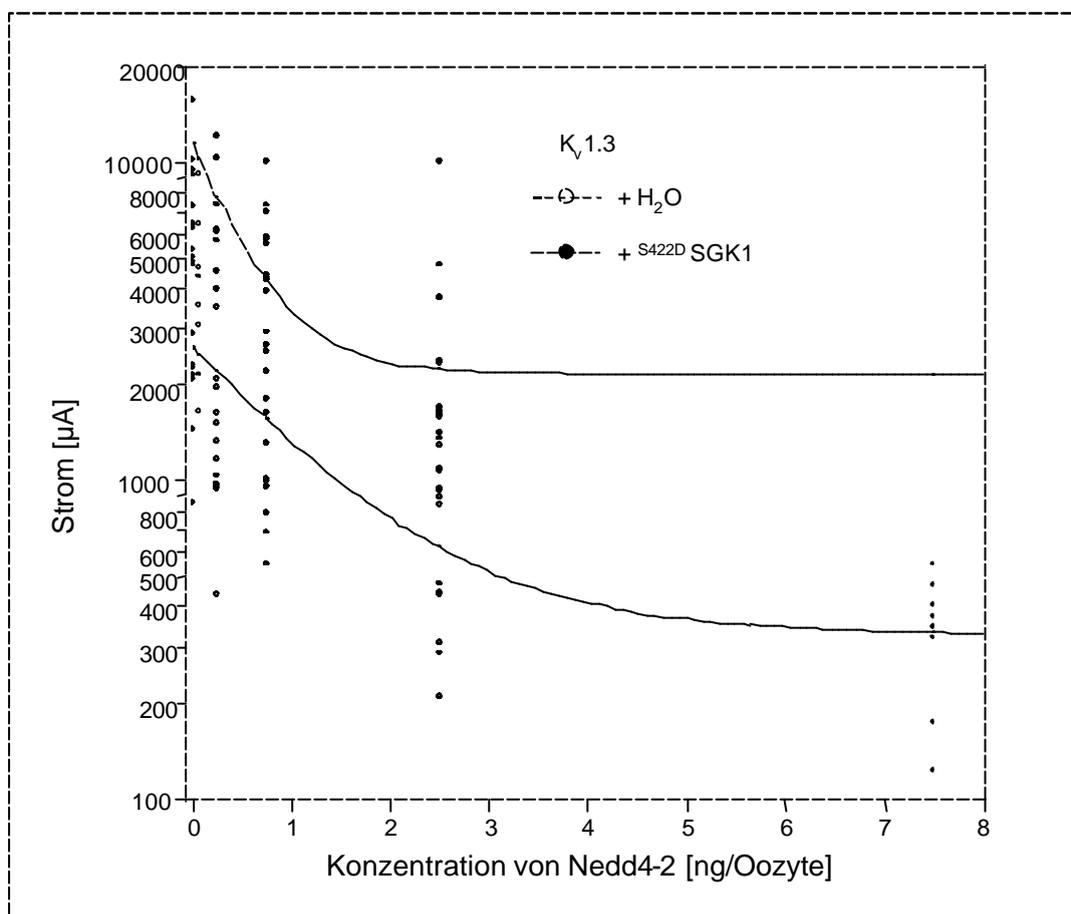


Abb. 34: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Nedd4-2. Spitzenströme nach Puls auf +20 mV von -80mV Haltepotential in Oozyten, die $K_v1.3$ allein (weiße Quadrate) oder $K_v1.3$ mit S^{422D} SGK1 (schwarze Kreise) zusammen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Nedd4-2 (0,075 / 0,25 / 0,75 / 2,5 / 7,5 ng/Oozyte) exprimieren.

Die Errechnung einer Regression mit einer Exponentialfunktion ergab für $K_v1.3$ mit H_2O eine Konzentrationskonstante t mit 63%iger Hemmung des Spitzenstromes bei Injektion von 1,19 ng/Oozyte und für $K_v1.3$ mit S^{422D} SGK1 bei 0,62 ng/Oozyte Nedd4-2 cRNA.

3.3.5 Stimulation anderer spannungsabhängiger K⁺-Kanäle

Mit den bisherigen Versuchen konnte keine direkte Interaktion zwischen Kv1.3 und Nedd4-2 nachgewiesen werden.

Mit molekularbiologischen Methoden sollte es möglich sein, die Bindungsstelle für Nedd4-2 am Kv1.3 so zu verändern, dass eine Bindung von Nedd4-2 nicht mehr möglich wäre. Um die möglichen Bindungsstellen näher einzugrenzen, wurden strukturell dem Kv1.3 sehr ähnliche spannungsabhängige Kanäle aus derselben Familie mit Nedd4-2 koexprimiert. Sollte einer dieser Kanäle nicht von Nedd4-2 reguliert werden, wäre es möglich, den Bereich des Moleküls, der für die Bindung mit Nedd4-2 wichtig ist, näher einzugrenzen, da nur wenige Bereiche verschieden von Kv1.3 sind.

In einem ersten Versuch wurden die spannungsgesteuerten K⁺-Kanäle Kv1.1 und Kv1.4 getestet, die Expression von Kv1.2 war leider bisher nicht möglich.

Es zeigt sich, dass Kv1.1 ebenso wie Kv1.3 durch die Ubiquitinligase Nedd4-2 herunterreguliert wird. Für Kv1.1 zusammen mit H₂O war der Spitzenstrom $11,2 \pm 2,4 \mu\text{A}$ (n=5). Koexpression mit Nedd4-2 führte zu einer signifikanten Verminderung des Spitzenstromes auf $4,9 \pm 2,0 \mu\text{A}$ (n=5). Kv1.4 allerdings scheint nicht von Nedd4-2 reguliert zu werden ($1,0 \pm 0,2 \mu\text{A}$; n=5 ohne Nedd4-2 auf $0,9 \pm 0,3 \mu\text{A}$; n=5 mit Nedd4-2, Abb. 35).

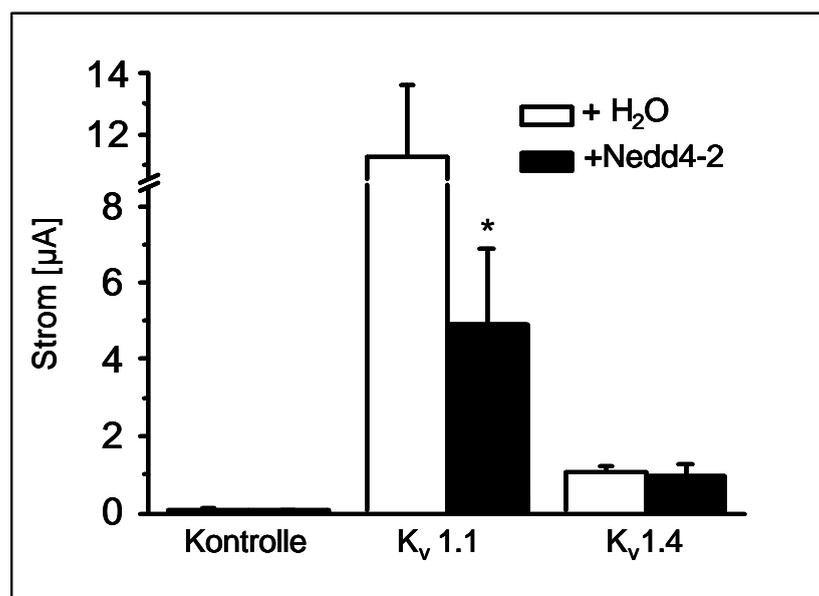


Abb. 35: Spitzenströme nach Puls auf +20mV von -80 mV Haltepotential in Oozyten, die nicht injiziert sind oder die spannungsgesteuerten K⁺-Kanäle Kv1.1 oder Kv1.4 mit und ohne Nedd4-2 exprimieren. Mittelwerte und Standardfehler, * $p < 0.05$ gegenüber H₂O.

3.3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse zum Kv1.3

Es konnte gezeigt werden, dass der K⁺-Kanal Kv1.3 durch die Serum- und Glucocorticoid-abhängige Kinase SGK hochreguliert wird. Diese Regulation steht im Zusammenhang mit der Ubiquitinligase Nedd4-2, von der bekannt ist, dass sie durch die SGK phosphoryliert und damit inaktiviert wird. Die Experimente zeigen, dass Kv1.3 nach Koexpression mit SGK länger in der Zellmembran verbleibt.

Die biophysikalischen Eigenschaften werden bei der Regulation nicht verändert. Die leichte Erhöhung der Inaktivierungskonstante τ_{inact} ist am ehesten durch eine höhere Dichte des Kanals in der Zellmembran zu erklären.

Ob eine direkte Interaktion zwischen Kv1.3 und Nedd4-2 stattfindet, konnte mit den bisherigen Versuchen nicht eindeutig gezeigt werden. Der starke hemmende Effekt von Nedd4-2 auch nach Injektion von kleinen cRNA Mengen spricht aber dafür. Das Fehlen eines PY-Motivs oder eines bekannten Motivs mit ähnlicher Funktion sprechen allerdings dagegen. Es kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass ein weiteres endogen in *Xenopus* Oozyten vorkommendes Protein, das den regulierten K⁺-Kanal in der Membran hält, der Angriffspunkt der SGK ist.

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war, den Einfluss der Serum- und Glucocorticoid-abhängigen Kinase SGK auf die Na⁺/K⁺-ATPase und auf die K⁺-Kanäle ROMK und K_v1.3 zu untersuchen. Dieses wurde mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme im lange etablierten *Xenopus laevis* Expressionssystem umgesetzt.

4.1 Na⁺/K⁺-ATPase

Die Na⁺/K⁺-ATPase kommt in allen tierischen Zellen vor. Sie ist elektrogen, daher kann ihre Aktivität mit elektrophysiologischen Methoden in *Xenopus* Oozyten gemessen werden. Folgende Probleme sind dabei zu berücksichtigen: Erstens könnte die Pumpe nach Expression heterologer Na⁺/K⁺-ATPase so stark exprimiert werden, dass eine weitere Stimulation durch die SGK nicht mehr erkannt werden kann. Zweitens sind die in *Xenopus* Oozyten ermittelten Eigenschaften exogener Na⁺/K⁺-ATPase nicht zwangsläufig mit denen im nativen Gewebe identisch, da Lipidzusammensetzung und Cholesterolgehalt der Zellmembran in Oozyten unterschiedlich von denen in mamalischen Zellen ist. Eine dadurch veränderte Dicke und Fluidität der Membranumgebung beeinflusst die Aktivität der Pumpe [217]. Für Cholesterol ist daneben auch ein die ATPase direkt modulierender Einfluss beschrieben [252]. Freie Fettsäuren hemmen die Na⁺/K⁺-ATPase [171]. Aus diesen Gründen haben wir die endogen in *Xenopus* Oozyten vorkommende Na⁺/K⁺-ATPase genutzt und nur die Serum- und Glucocorticoid-abhängige Kinase (SGK) heterolog exprimiert.

Es gibt 4 verschiedene α - und 3 verschiedene β -Untereinheiten der Na⁺/K⁺-ATPase. In *Xenopus* Oozyten sind mindestens die α_1 -Untereinheit und die β_1 - sowie β_3 -Untereinheit exprimiert [55, 90]. Die β -Untereinheiten, die für die richtige Funktion und den Einbau der α -Untereinheiten in die Membran gebraucht werden, sind in Oozyten limitierend für den Einbau funktioneller Pumpen [115].

Gewebeabhängige Expression dieser verschiedenen Isoformen mit jeweils unterschiedlichen Substrataffinitäten und Blockersensitivitäten reguliert die

Pumpaktivität in vivo [220]. So sind z.B. die α_1 - und β_1 -Isoformen überall exprimiert, die α_2 -Isoform in Nerv, Muskel und Herz, während die α_3 -Isoform hauptsächlich im Gehirn und die β_2 -Isoform hauptsächlich im Nervensystem exprimiert ist [28, 55, 147, 167]. Neuerdings sind neben medikamentös verwendeten Digitalisglykosiden auch endogen zirkulierende Inhibitoren entdeckt worden, die vermutlich in der Nebenniere produziert werden. Zum Teil handelt es sich um Ouabain selbst, zum Teil um homologe Stoffe [100, 134].

In der hier vorliegenden Untersuchung zeigt sich durch Injektion sowohl der permanent aktiven S^{422D}SGK1 als auch der Wild-Typ Isoformen (SGK1-SGK3) in Oozyten eine 1,5-3fache Stimulation des Ouabain-sensitiven Stromes der endogenen Na⁺/K⁺-ATPase gegenüber mit Wasser injizierten Oozyten.

Die Pumpleistung der Na⁺/K⁺-ATPase hängt von den Substratkonzentrationen von ATP, K⁺ und insbesondere Na⁺ ab. In *Xenopus* Oozyten wird die Na⁺/K⁺-ATPase durch intrazelluläres Na⁺_i von ~10-40 mM halbmaximal aktiviert [205]. In den SGK exprimierenden Zellen war die intrazelluläre Na⁺_i-Konzentration sowohl vor als auch nach dem Aufladen der Zellen mit Na⁺ durch K⁺-freie Inkubation gegenüber den Kontrollzellen erniedrigt. Dieses schließt eine indirekte Aktivierung der Pumpen durch höheres Na⁺_i in den SGK exprimierenden Zellen aus. Insgesamt lag der intrazelluläre Na⁺_i-Anstieg unter dem in der Literatur beschriebenen Anstieg durch K⁺-freie Inkubation [55, 70]. Dieses könnte daran liegen, dass wir keine Ca²⁺-freie Lösung verwendeten und mit physiologischer Na⁺-Konzentration inkubiert haben. Extrazelluläres K⁺ hat in vivo weniger Einfluss auf die Pumpleistung, da die Konzentration relativ konstant ist. Grundlage des Messprotokolls war Wegnahme und Zugabe einer konstanten K⁺-Menge, um die Pumpe „ein- und auszuschalten“.

Intrazelluläres K⁺_i wirkt als kompetitiver Na⁺-Antagonist an den Bindungsstellen der ATPase [217]. Da die intrazelluläre K⁺_i-Konzentration aber sehr hoch ist, und bei den kurzen Inkubationszeiten nur wenig K⁺ ausströmen kann, dürfte es zu keinen relevanten Änderungen der K⁺_i-Konzentration kommen. Die intrazelluläre ATP-Konzentration ist bei einem K_{0,5}-Wert von 300-800 μ M unter unseren und den meisten natürlich vorkommenden Bedingungen, mit

Ausnahme vielleicht im Nierenmark, sättigend [206]. Natürlich ist die Funktion der Pumpe, wie die eines jeden Enzyms, temperaturabhängig [4]. Außerdem moduliert der extrazelluläre pH-Wert die Funktion der Na⁺/K⁺-ATPase durch Wechselwirkung mit der Kationen-Bindung [188]. Temperatur und pH-Wert der Badlösung waren während der gesamten Messung konstant. Die beobachtete Stimulation des Pumpstromes durch die SGK ist also nicht auf einen Einfluss dieser Parameter zurückzuführen.

Unter physiologischen Bedingungen muss die Regulation der Na⁺/K⁺-ATPase naturgemäß am stärksten in denjenigen Zellen sein, die aufgrund physiologischer Aufgaben stark schwankenden Na⁺-Transportraten ausgesetzt sind. Dies sind Zellen von Niere, Darm, Muskel oder Nerv [217]. Die Dichte der Na⁺/K⁺-ATPase ist dementsprechend in verschiedenen Geweben stark unterschiedlich (einige Moleküle pro μm^2 in Erythrozyten bis zu einigen Tausend Molekülen pro μm^2 in Nierenepithelzellen [144]). Dieser Sachverhalt unterstreicht die Bedeutung der Regulation von Ein- und Ausbau der Na⁺/K⁺-ATPase in die Zellmembran.

Ein großer Einfluss auf die Na⁺/K⁺-ATPase kommt dabei Hormonen zu, die den Na⁺/K⁺-Haushalt oder den H₂O-Haushalt regulieren, und Hormonen und Transmittern, die in erregbaren Geweben wie Neuronen, Muskeln und Schrittmacherzellen wirksam sind [67, 109]. Man unterscheidet kurzfristige („short-term“) Wirkungen, die durch direkte Wirkungen auf die Na⁺/K⁺-ATPase hervorgerufen werden, und langfristige Wirkungen („long-term“), die Neusynthese und Einbau der Pumpe vermitteln.

Unter den Katecholaminen ist zunächst Dopamin als natriuretischer Faktor zu erwähnen. Dopamin wirkt über DA₁- und DA₂-Rezeptoren hemmend auf die Na⁺/K⁺-ATPase [11]. Adrenalin dagegen stimuliert über β -Rezeptoren bzw. α -Rezeptoren gewebeabhängig und isoformspezifisch das Enzym [88, 88, 107, 238]. Außerdem beeinflussen Parathormon [64], Angiotensin II [37], IGF-1 [138], atrialer natriuretischer Faktor [17] und ADH [249] die Na⁺/K⁺-ATPase.

Die Signaltransduktionskaskaden, über die die Hormone wirken, sind teilweise aufgeklärt. Im einzelnen sind Proteinkinase A (PKA) [14, 21, 41, 46],

Proteinkinase C (PKC) [14, 46, 71, 72], Proteinkinase G (PKG) [85], Tyrosinkinase [77], Phospholipase A₂, Proteinphosphatase 1 (PP1) [84] und Proteinphosphatase 2 (PP2) [30] beteiligt.

Dabei werden über die einzelnen Kinasen in unterschiedlichen Spezies, Gewebearten oder unter verschiedenen Bedingungen isoformspezifisch z.T. gegensätzliche Wirkungen erzielt [144, 217]. Die Phosphorylierungsstelle, an der PKA angreift ist Serin in Position 943 an der α -Untereinheit. Phosphorylierung durch PKA führt beispielsweise bei Na⁺/K⁺-ATPasen, die aus $\alpha 1/\beta 1$ - oder $\alpha 2/\beta 1$ -Untereinheiten bestehen, zu einer Hemmung, bei Na⁺/K⁺-ATPasen, die aus $\alpha 3/\beta 1$ -Untereinheiten bestehen, zu einer Aktivierung [29]. Bei niedrigem intrazellulären Ca²⁺ wirkt PKA stärker aktivierend als bei hohem intrazellulären Ca²⁺. PKC wirkt hemmend auf die Na⁺/K⁺-ATPase bei niedrigem intrazellulären Ca²⁺, aber aktivierend bei hohem intrazellulärem Ca²⁺ [33, 44, 45]. In *Xenopus* Oozyten fördert PKC die Endozytose durch Phosphorylierung an Serin 23 der α -Untereinheit. Dieses führt zur Hemmung der Pumpaktivität. In COS-Zellen führt Phosphorylierung an Serin 16 durch PKC zu einer Erhöhung der Affinität für Na⁺ und damit zu einer Stimulation der Pumpaktivität [76]. In glatten Gefäßmuskelzellen wird PKC-abhängig die durch Serum induzierte mRNA-Zunahme der β -Untereinheit in der Zelle und damit eine langfristige positive Regulation vermittelt [166].

Der die Na⁺/K⁺-ATPase hemmende Effekt von Dopamin ist im proximalen Tubulus über ein G-Protein und PKC vermittelt [19, 20, 22], im distalen Tubulus über PKA [190, 214]. PKG wirkt auf die Na⁺/K⁺-ATPase aktivierend in Kolon, quergestreiftem Muskel und Gehirn [140, 183] und hemmend in Gefäßmuskelzellen und Niere [154, 192].

Diese kurze Aufstellung intrazellulärer und membranständiger Proteine mit Wirkung auf die Aktivität der Na⁺/K⁺-ATPase macht deutlich wie komplex die Na⁺/K⁺-ATPase reguliert ist. Die mit dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse erweitern die erwähnten Regulationswege der Na⁺/K⁺-ATPase über PKA, PKC und PKG [217] um die Serum- und Glucocorticoid-abhängige Kinase SGK (Abb. 36).

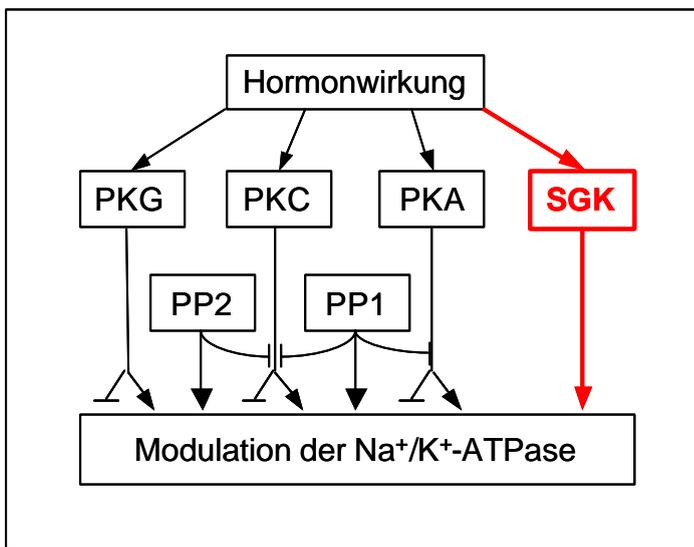


Abb. 36: Signaling der Hormonwirkung auf die Na⁺/K⁺-ATPase modifiziert nach [217]; Proteinkinase G (PKG), Proteinkinase C (PKC), Proteinkinase A (PKA), Phosphatase 1 und 2 (PP1, PP2).

Steroidhormone und Insulin sind die potentesten Stimulatoren der Serum- und Glucocorticoid-abhängigen Kinase SGK. Sowohl für Steroidhormone als auch für Insulin ist eine Stimulation der Na⁺/K⁺-ATPase bekannt.

Im Falle des Insulins ist die Regulation der Na⁺/K⁺-ATPase eng mit dem K⁺-Haushalt verbunden. Die Stimulation des NKCC-Kotransports durch Insulin führt sekundär über eine höhere intrazelluläre Na⁺-Konzentration zu einer Steigerung der Pumpfunktion. In der Niere erhöht Insulin auch die Na⁺-Affinität der Na⁺/K⁺-ATPase [78, 79]. Doch Insulin stimuliert die Na⁺/K⁺-ATPase kurzfristig auch über den Einbau von Pumpen aus dem intrazellulären Pool [74, 211-213]. Über den genauen Mechanismus ist noch wenig bekannt [217]. Hier könnte die SGK für die Signaltransduktion zuständig sein. Bindung von Insulin oder IGF1 an die jeweiligen Rezeptoren führt zu Aktivierung von PDK1 über die PI3-Kinase [209]. Die Serum- und Glucocorticoid-abhängige Kinase SGK wird wiederum von PDK1 aktiviert [124, 132]. Die SGK könnte so über die Na⁺/K⁺-ATPase an dem steigernden Effekt von Insulin auf die K⁺-Aufnahme der Zellen und die renale tubuläre Na⁺-Reabsorption beteiligt sein.

Neben Glucocorticosteroiden, die einen vorwiegend langfristigen stimulierenden Effekt über Typ II-Rezeptoren auf die Na⁺/K⁺-ATPase ausüben [141, 221, 260], haben insbesondere auch Mineralocorticosteroide eine Steigerung der

Pumpfunktion zur Folge [110, 247]. Diese scheint z.T. über cAMP vermittelt zu werden [3, 248] und in Muskelzellkulturen spezifisch nur die α_1 -Isoform zu betreffen [169]. Als „short-term“-Effekt wirken die Mineralocorticosteroide einerseits über eine Erhöhung der Affinität zu Na⁺ [18, 179], interessanterweise aber auch über eine Erhöhung der Anzahl von Pumpen in der Membran. Na⁺-Einstrom führt aldosteronabhängig zu einer Zunahme der Pumpendichte in der Zellmembran [198].

Die Gabe von Aldosteron führt innerhalb von Stunden kurzfristig zu einem Anstieg der SGK im Zytosol der Zellen im distalen Nephron [176, 228]. Sie vermittelt damit die schnelle Antwort auf Aldosteron bei der Na⁺-Resorption durch Zunahme der Dichte von epitheliale Na⁺-Kanal in der luminalen Zellmembran [143, 227, 228].

Die mit dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse legen nahe, dass hiermit auch eine direkte schnelle Regulation der Na⁺/K⁺-ATPase verbunden ist, und dass diese Stimulation durch die SGK vermittelt wird (Abb. 38). Aufgrund der bisherigen Kenntnisse über die Wirkungsweise der SGK ist die Stimulation am ehesten auf vermehrten Einbau von Pumpen in die Zellmembran zurückzuführen. Dafür sprechen auch Ergebnisse von Summa et al., die in Zellkulturen von Hauptzellen des Sammelrohres von Ratten (mpkCCDc14-Zellen) durch Gabe von Aldosteron sowohl eine Steigerung des Pump-Stromes als auch eine höhere Dichte der Oberflächenexpression der Pumpe fanden [210]. Die Resultate stehen in Übereinstimmung mit unabhängigen Ergebnissen von Zecevic et al. (2002), die eine 2 fache Stimulation des Pumpstromes durch Injektion der α -Untereinheit von Ratten-Na⁺/K⁺-ATPase fanden [259].

Die Na⁺/K⁺-ATPase weist nicht das typische Bindungsmotiv (Arg-Xaa-Arg-Xaa-Xaa-Ser/Thr Sequenz) für die SGK auf (siehe Kap.1.2.4) [124, 125]. Deshalb ist eine Beteiligung weiterer Mediatoren nicht unwahrscheinlich. Proteine wie Ankyrin und Adducin kämen dafür in Frage. In polarisierten Epithelzellen findet ein gezielter Einbau der Pumpe in die basolaterale Membran statt [69]. Vermittelt wird dieser gezielter Einbau dabei durch direkte Interaktion der α -Untereinheit der Na⁺/K⁺-ATPase mit den Proteinen Ancyryn [81, 163, 165] und

Adducin [80, 149]. Ankyrin und Adducin sind wiederum verbunden mit Spectrin und Actin, die das basolaterale Zytoskelett bilden [69, 164].

Die gleichzeitige Regulation von ENaC und Na⁺/K⁺-ATPase ist physiologisch notwendig, da luminal durch den ENaC vermehrt aufgenommenes Na⁺ basolateral durch die Na⁺/K⁺-ATPase weiter ins Blut gegeben werden könnte. Das bedeutet natürlich, dass die SGK eine die Na⁺-Resorption fördernde und damit auch den Blutdruck steigernde Wirkung hat.

In der SGK ^{-/-} Maus konnte gezeigt werden, dass diese Wirkung funktionell relevant ist und nicht nur in Modellsystemen wie *Xenopus* Oozyten auftritt. Das Fehlen der SGK führte dazu, dass die Maus unter salzarmer Diät die Na⁺-Resorption nicht ausreichend steigern und so die Na⁺-Ausscheidung in den Urin nicht ausreichend verringern konnte. Die Tiere entwickelten unter salzarmer Diät innerhalb von 3 Tagen eine deutliche Abnahme des Blutdrucks und des Körpergewichts infolge von Wasserverlust, sowie eine Zunahme der Urinmenge/24h und eine sehr starke Erhöhung des Aldosteronspiegels [250].

Abgesehen von einem erhöhten Aldosteronspiegel in Ruhe, waren die übrigen Parameter unter normaler Salzdiät aber nicht unterschiedlich in den SGK1 ^{-/-} Mäusen, was zeigt, dass die SGK nicht allein für die Regulation der Salzresorption zuständig ist.

Ergebnisse von Zwillingsstudien zeigen, dass die SGK auch bei der Blutdruckregulation des Menschen eine Rolle spielt. Polymorphismen im SGK-Gen gehen danach tatsächlich mit höherem Blutdruck einher [38]. Auch für die Erklärung der Hypertonie bei der Akromegalie könnte die SGK ein Schlüssel sein. Über Aktivierung der SGK über IGF1, IP3 und PDK käme es zu einer vermehrten Na⁺-Rückresorption und Wasserretention und damit zu einer Erhöhung des Blutdrucks.

4.2 ROMK1

Die Regulation des *renal outer medullary K⁺-channel* ROMK1 hängt eng mit der oben beschriebenen Regulation der Na⁺-Resorption zusammen. Der ROMK ist ebenfalls in den distalen Nephronabschnitten exprimiert [91]. Aldosteron führt im kortikalen Sammelrohr neben der Steigerung der Na⁺-Resorption zu einer vermehrten K⁺-Ausscheidung durch den apikal lokalisierten ROMK1 [93]. In diesen weiter distal liegenden Abschnitten des Nephrons ist die luminale Membran durch „tight junctions“ zunehmend elektrisch isoliert von der basolateralen Membran. Hier würde eine hohe luminale Na⁺-Leitfähigkeit die luminale Membran stark depolarisieren. K⁺-Ausstrom durch den ROMK trägt entscheidend zur Erhaltung der elektrischen Triebkraft für die Na⁺-Resorption bei [91]. Dieser enge Zusammenhang und die Koexpression von ROMK und SGK in den distalen Abschnitten des resorbierenden Nephron-Epithels deutet auf eine mögliche Wechselwirkung hin [229, 246].

Für die Untersuchung der K⁺-Kanäle ROMK und K_v1.3 war es nicht möglich, endogene Kanalproteine zu nutzen und nur die Kinase zu injizieren, da beide Proteine nicht in der zu untersuchenden Form endogen in *Xenopus* Oozyten vorkommen. Hier mussten deshalb sowohl der jeweilige K⁺-Kanal als auch die Kinase bzw. die weiteren Regulatorproteine heterolog exprimiert werden.

Für den *renal outer medullary K⁺-channel* ROMK1 konnte ebenfalls eine Beteiligung der SGK an der Regulation des Kanals nachgewiesen werden. Sie erfordert allerdings die gleichzeitige Expression von SGK und dem *Natrium-Hydrogen-Exchanger-Regulator-Faktor 2* (NHERF2) zusammen mit ROMK1 in *Xenopus* Oozyten. Expression von nur SGK oder nur NHERF2 mit ROMK führt zu keinerlei Stimulation, wie dies bereits in Voruntersuchungen beschrieben worden war [43]. Koexpression von ROMK zusammen mit SGK und NHERF2 stimuliert in den hier vorliegenden Untersuchungen den von K⁺ getragenen Strom allerdings mindestens 2-fach. Dieser Strom war sensibel für Ba²⁺, wie es für ROMK1 beschrieben ist [104]. Der intrazelluläre pH_i der Oozyten ist dabei

durch die Kinase und NHERF2 nicht verändert und damit ein indirekter Effekt durch Alkalisierung des Zytosols ausgeschlossen.

NHERF2 ist ein PDZ-Domain tragendes Protein und verbindet Membranproteine mit dem Zytoskelett [229, 257]. Es ist demnach möglich, dass NHERF2 den Einbau von ROMK in die Zellmembran stabilisiert. Dafür scheint gleichzeitig auch SGK notwendig zu sein.

Das Strom-Spannungs-Diagramm (I/V-Diagramm) zeigt einen einwärts rektifizierenden Strom, wie er für ROMK in Kapitel 1.1.2 beschrieben wurde. Erhöhung des extrazellulären K^+ von 2 mM auf 20 mM führt zu einer deutlichen Verschiebung des Umkehrpotentials nach rechts. Dieses lässt zwei Schlüsse zu: Erstens handelt es sich um einen von K^+ getragenen Strom, der durch ROMK1 erzeugt wird, und zweitens geht die Stimulation nicht mit veränderten Öffnungseigenschaften des Kanals einher. Daher ist es wahrscheinlich, dass die Regulation auch in diesem Fall durch eine Erhöhung der Dichte des ROMK1 in der Membran abläuft. In weiteren Experimenten in unserem Labor konnte mittlerweile durch Inkubation mit Brefeldin gezeigt werden, dass der Abbau des Kanals aus der Membran durch die Koexpression mit ^{S422S}SGK1 und NHERF2 verzögert wird [256]. Allerdings wurde auch eine leichte Verschiebung des pK_a vom ROMK1 zu sauren Werten durch die Koexpression mit ^{S422S}SGK1 und NHERF2 festgestellt. Dieses könnte durch zusätzliche direkte Wirkungen des Proteinkomplexes aus SGK und NHERF auf den pH-sensitiven ROMK1 bedingt sein [187, 256].

Bisher war bekannt, dass eine Aktivierung des Kanals durch Erniedrigung des intrazellulären ATP, Phosphorylierung durch PKA und Glykosylierung verursacht wird [12, 160]. Eine Inaktivierung wurde durch die Src-Kinase, PKC, Polyamine, niedrigen intrazellulären pH-Wert und Arachidonsäure beschrieben [187]. Außerdem hemmt eine Protein-Tyrosin-Kinase den Kanal durch verminderten Einbau in die Plasmamembran, während eine Protein-Tyrosin-Phosphatase ROMK durch vermehrten Einbau in die Membran aktiviert [159]. Die Einbeziehung von SGK/NHERF2 in die Regulation von ROMK erweitert das Spektrum der Regulation dieses Kanals. Da NHERF2 auch an der Regulation

des NHE3 beteiligt ist, wird durch die SGK eine Verbindung von K^+ - und H^+ -Regulation in der Niere geschaffen. Dieses ist um so plausibler, als die K^+ -Ausscheidung eine Funktion des Säure-Basen-Haushaltes ist [93].

Es konnte also gezeigt werden, dass die Serum- und Glucocorticoid-abhängige Kinase SGK als dritte Komponente des schnellen Aldosteron-Effektes neben Stimulation von ENaC [231] und Na^+/K^+ -ATPase auch an der Regulation von ROMK1 beteiligt ist (Abb. 38).

4.3 $K_v1.3$

Der zweite in dieser Arbeit untersuchte K^+ -Kanal ist der spannungsgesteuerte K^+ -Kanal $K_v1.3$. Durch gewebespezifische Expression und heteromere Zusammensetzung der K_v -Kanäle sind vielfältige Regulationsmöglichkeiten beschrieben [12]. Auch die Phosphorylierung des N-Terminus der K_v -Kanäle durch PKA und PKC ist bekannt. Beide Kinasen hemmen den K^+ -Strom [136, 196].

Ebenso ist der Einfluss von Hormonen, wie beispielsweise Glucocorticoiden für $K_v1.5$ [126] oder IGF-1 für $K_v1.3$ [86], beschrieben. Für die Regulation des $K_v1.3$ durch IGF-1 konnte in HEK293 Zellen die Beteiligung von sowohl PDK1 und SGK1 nachgewiesen werden [86].

In dieser Arbeit kann durch Koexpressionsstudien in *Xenopus* Oozyten eine 2-4 fache Stimulation des $K_v1.3$ -Stromes sowohl durch die aktive Mutante der Serum- und Glucocorticoid-abhängige Kinase S^{422D} SGK1, als auch durch alle Isoformen (SGK1-SGK3) gezeigt werden. Die Regulation führt zu einer langsameren Inaktivierung des Kanals. Allerdings ist diese langsamere Inaktivierung auch für den Fall beschrieben, dass durch Injektion von größeren cRNA-Mengen eine höhere Kanaldichte in der Oozytenmembran induziert wurde [105]. Es muss sich dabei also nicht um strukturelle Veränderungen des $K_v1.3$ handeln. Wie für die Na^+/K^+ -ATPase und den ROMK1 ist ein Einfluss der SGK auf den Ein- und Ausbau des Kanals aus der Zellmembran

wahrscheinlich. In den Experimenten kann durch Inkubation mit Brefeldin A gezeigt werden, dass durch die SGK vorwiegend der Ausbau aus der Membran verzögert wird. Brefeldin A stoppt den Transport von Vesikeln vom endoplasmatischen Retikulum und damit auch den Einbau von Proteinen in die Zellmembran, so dass nur noch Abbau des Kanals stattfindet [208].

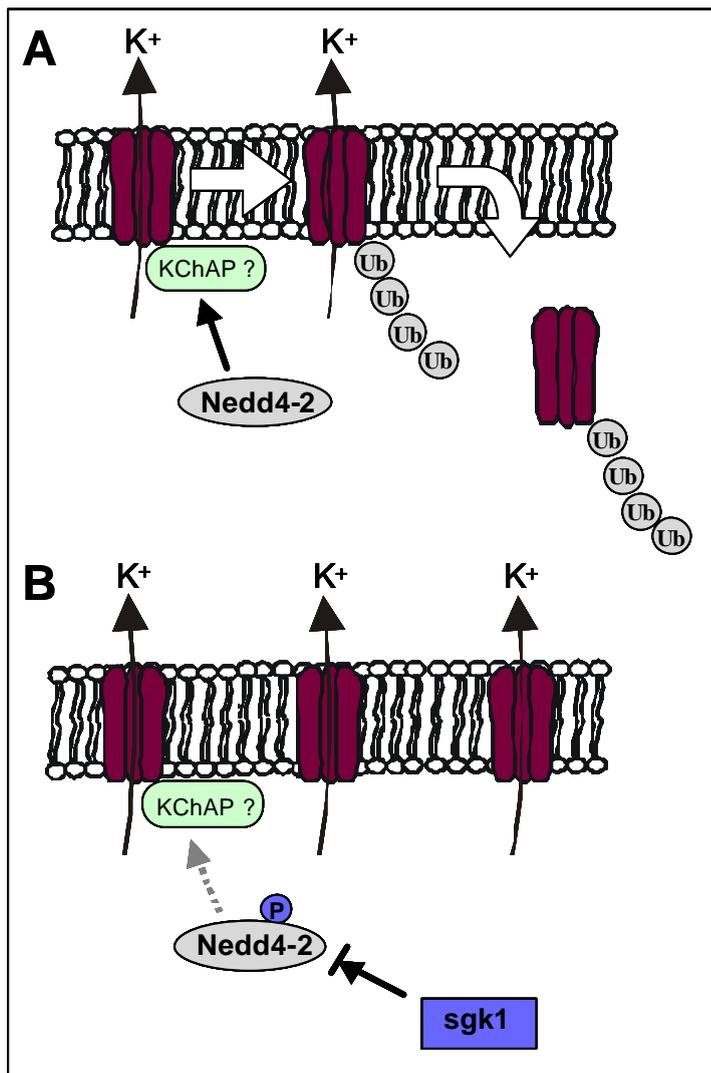


Abb. 37: A Ubiquitinierung und Abbau des K⁺-Kanals durch Nedd4-2. KChAP als mögliches Adapterprotein.

B Hemmung von Nedd4-2 durch SGK abhängige Phosphorylierung in Anlehnung an [62].

Auf der Suche nach einem Mechanismus für diesen verzögerten Ausbau wurde die Wirkung der Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 auf K_v1.3 untersucht. Nedd4-2 bindet Ubiquitin an verschiedene zelluläre Proteine und bereitet damit deren Abbau auf dem Proteasom-Ubiquitin-Abbau-Weg vor [94, 180]. Es ist in vielen Geweben exprimiert, einschließlich Herz, Plazenta, Lunge, Leber,

Skelettmuskel und Niere [9]. Nedd4-2 wird von der SGK phosphoryliert und dadurch inaktiviert. Dieses ist der Mechanismus, mit dem ENaC von der SGK hochreguliert wird, da ENaC von Nedd4-2 ubiquitiniert und dadurch schneller aus der Membran entsorgt wird (Abb. 37) [62, 117, 207, 208]. Mutationen von Nedd4-2 stehen in Zusammenhang mit dem Liddle-Syndrom [118].

Gleichzeitige Expression von Nedd4-2 und $K_v1.3$ in *Xenopus* Oozyten führt in den hier durchgeführten Experimenten tatsächlich zu einer deutlichen Reduktion des $K_v1.3$ -Stromes. Diese Wirkung ist durch zusätzliche Koexpression von SGK wieder aufgehoben. Dabei zeigen SGK1 und SGK3, wie schon bei den Experimenten mit Brefeldin A, eine bessere Wirksamkeit. Die Funktion von Nedd4-2 ist an das Vorhandensein bestimmter Erkennungsmotive (PY-Motiv) auf dem zu regulierenden Protein gebunden [9, 75]. Da der $K_v1.3$ dieses Motiv nicht besitzt, könnte noch ein weiteres endogen in Oozyten vorkommendes Protein an der Stabilisation des Kanals in der Zellmembran beteiligt sein, das dann seinerseits das PY-Motiv besitzt und von Nedd4-2 ubiquitiniert wird. Verstärkte Expression der β -Untereinheit ist beispielsweise ein bekannter Regulationsmechanismus, der z.B. in Lymphozyten die Membrandichte der α -Untereinheiten erhöht [152]. Auch die bekannten β -Untereinheiten des $K_v1.3$ weisen allerdings kein PY-Motiv auf. Ein möglicher Kandidat wäre aber das Regulatorprotein KChAP. Als Chaperon ist es an der richtigen Faltung der Tertiärstruktur von Proteinen beteiligt [4]. Eine Interaktion von KChAP mit K_v -Kanälen über deren N-Terminus ist bekannt. KChAP stimuliert in Oozyten heterolog exprimierte $K_v1.3$ Kanäle [131]. Es hat interessanterweise ein PY-Motiv zwischen den Aminosäuren 419-423 (Pro-Pro-Pro-Gly-Tyr). Da endogen viele Regulatorproteine in *Xenopus* Oozyten vorkommen ist es nicht unwahrscheinlich, dass ein endogenes „KChAP-ähnliches“ Protein, das durch Nedd4-2 reguliert wird, eine Rolle beim Einbau des $K_v1.3$ in die Oozytenmembran spielt.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Interaktion über eine andere, noch nicht bekannte Aminosäuresequenz direkt mit dem Kanal stattfindet, zumal in der letzten Zeit mehrere verschiedene solcher Bindungsstellen gefunden worden

sind. Diese sind Aminosäuresequenzen, die Motive wie Pro-Pro-Leu-Pro, (Pro/Arg)Pro-Arg, phosphoryliertes Serin-Prolin pS-P enthalten oder Sequenzen, die reich an Prolin, Glyzin und Methionin sind [119]. Der Kv1.3 besitzt am N-Terminus zwei Prolin-reiche Regionen, die mögliche Bindungsstellen enthalten können [51]. Mutationen in diesen Bereichen zu machen, könnte Gegenstand zukünftiger Experimente sein. Eine dieser Regionen überschneidet sich mit der T0-Region, dessen Deletion beim rabKv1.3 zu einer Stimulation des Stromes führt. Dieses ist zumindest teilweise durch höhere Kanaldichte in der Membran verursacht [196]. Möglicherweise befindet sich hier die Erkennungsdomäne für Nedd4-2. Weitere molekularbiologische Untersuchungen müssten folgen. Andererseits spielt beim Einbau der Kv-Kanäle in die Membran auch ein Aminosäuremotiv des C-Terminus eine entscheidende Rolle [139].

Die in dieser Arbeit gezeigten Daten schließen nicht aus, dass es sich bei der Hemmung des Kv1.3 durch Nedd4-2 um unspezifische Effekte handelt. Da die Hemmung sehr groß und bereits mit kleinen Konzentrationen von Nedd4-2 deutlich ist, ist ein unspezifischer Effekt aber unwahrscheinlich. Zumal die injizierten cRNA-Konzentrationen von Nedd4-2 vergleichbar sind mit denen, die eine Hemmung des ENaC bewirken [75] (Abb. 34).

Über die Regulation des spannungsgesteuerten K⁺-Kanals Kv1.3 hat die SGK Einfluss auf die Proliferation und Apoptose verschiedener Gewebearten. Es konnte gezeigt werden, dass Kv-Kanäle hochreguliert werden, wenn die Zellproliferation angeregt wird, bzw. Kv1.3 gehemmt wird [86], wenn Apoptose induziert wird [97]. Der Kv1.3 hält dabei das Membranpotential der Zelle negativ und ermöglicht so Ca²⁺-Einstrom, der die Zellproliferation aktiviert [215]. Durch Förderung der Proliferation von Schwanzzellen tragen Kv-Kanäle zur Myelinisierung der Axone bei [204]. In Oligodendrozyten konnte gezeigt werden, dass Blockade des Kv1.3 im Zellzyklus den Übergang in die S-Phase hemmt [47].

Durch Stimulation von spannungsgesteuerten K⁺-Kanälen wirkt die SGK anti-apoptotisch und fördert die Proliferation in Epithelzellen [156, 172]. Die

Expression von K_v -Kanälen reflektiert auch die starke Proliferation von Epithelzellen in der Nierenentwicklung [34]. Der proliferative Effekt von IGF-1 auf HEK293 Zellen, der über die SGK vermittelt wird, ist unter Blockade der K^+ -Leitfähigkeit nicht sichtbar [86].

In diesem Zusammenhang ist auch interessant, dass $K_v1.3$ in schnell proliferierenden Zellen vom Kolon- und Prostatakarzinom hoch exprimiert wird [1, 2]. Ob dieses auch mit einer vermehrten Expression der SGK einhergeht, bleibt zu untersuchen.

Neurodegenerative Erkrankungen sind eine weitere Gruppe von Erkrankungen, bei denen Stimulation des $K_v1.3$ durch die SGK wichtig sein könnte. Zu starke Aktivierung der Mikroglia wird als eine Ursache dieser Erkrankungen diskutiert [193]. Da $K_v1.3$ zu einer Aktivierung der Mikroglia führt [48, 120], könnte die Entwicklung von neurodegenerativen Erkrankungen mit einem SGK Polymorphismus verbunden sein, der zu einer „überaktiven“ SGK führt.

Neben Gliazellen ist die SGK auch in Neuronen exprimiert [239]. $K_v1.3$ ist in Neuronen an der Aufrechterhaltung eines negativen Membranpotentials und der Repolarisation nach einem Aktionspotential beteiligt. Über die Regulation des $K_v1.3$ könnte die SGK Einfluss auf die Erregbarkeit von Gehirnzellen haben. Es konnte gezeigt werden, dass die SGK durch osmotisch bedingtes Schrumpfen stark hochreguliert wird [239]. Damit steht in Einklang, dass eine Erhöhung der extrazellulären Osmolarität zu einer verminderten Erregbarkeit und Anfälligkeit gegenüber Epileptischen Anfällen führt, während eine Erniedrigung der extrazellulären Osmolarität zu einer erhöhten Erregbarkeit und Anfälligkeit gegenüber Epileptischen Anfällen führt [10].

Interessanterweise ist die SGK im Gehirn schnell lernender Ratten stärker exprimiert als im Gehirn langsam lernender Ratten [222].

Weiterhin könnte auch der $K_v1.3$ eine Rolle in der K^+ -Homöostase in der Niere spielen. Desir et al. berichten, dass ein neu klonierter $rabK_v1.3$ von Kaninchen im Sammelrohr der Niere exprimiert ist, und postulieren, dass er sich in der basolateralen Membran befindet. Dort soll er für die Resorption von K^+ unter Bedingungen zuständig sein, in denen das luminaire Na^+ niedrig und das luminaire K^+ hoch ist [196, 251]. Kollokalisierung mit der SGK in diesen Zellen und

die in dieser Arbeit gezeigte Stimulation des $K_v1.3$ durch die SGK macht eine Wechselwirkung auch *in vivo* wahrscheinlich. Je nach Verfügbarkeit von NHERF2 oder Nedd4-2 würde dann durch die SGK eher der ROMK oder der $K_v1.3$ stimuliert. Dieses unterstreicht die Bedeutung der SGK in der Regulation des Na^+ - und K^+ -Haushaltes (Abb. 38).

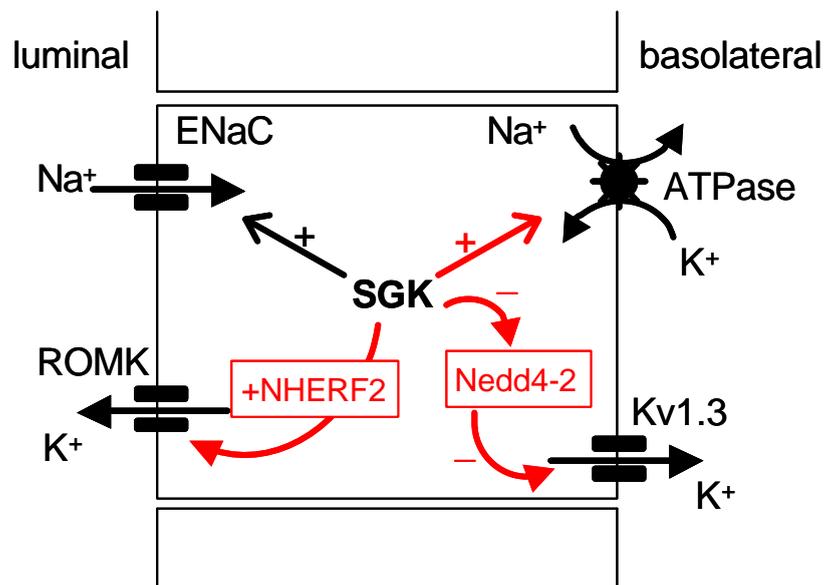


Abb. 38: Regulation von Membranproteinen durch die SGK über NHERF2 und Nedd4-2.

5 Zusammenfassung

Mit dieser Arbeit konnten weitere Aufschlüsse über die Bedeutung der Serum- und Glucocorticoid-abhängigen Kinase SGK in der Regulation grundlegender Zellfunktionen gewonnen werden (Abb. 38):

1. Alle Isoformen der SGK bewirken eine Stimulation der endogenen Na^+/K^+ -ATPase von *Xenopus laevis* Oozyten. Dieses war sowohl an einem größeren Pumpstrom als auch an einer niedrigeren intrazellulären Na^+ -Konzentration der SGK exprimierenden Oozyten gegenüber Oozyten erkennbar, die entweder keine oder eine transdominant negative SGK exprimierten.
2. Die SGK ist auch bei der Regulation des im renalen Sammelrohr der Niere vorkommenden K^+ -Kanals ROMK1 entscheidend beteiligt. Notwendig für diese Interaktion ist die zusätzliche Expression von NHERF2. Als PDZ-Domäne enthaltendes Protein ist NHERF2 am Einbau und Verankern von Proteinen in der Zellmembran beteiligt.
3. Stimulation des spannungsgesteuerten K^+ -Kanals $\text{K}_v1.3$ durch die SGK geschieht durch verminderten Ausbau des Kanals aus der Zellmembran. Die Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 bewirkt eine deutliche Inaktivierung des $\text{K}_v1.3$, vermutlich durch verstärkten Ausbau des Kanals aus der Zellmembran. Ob dies durch eine direkte Interaktion zwischen $\text{K}_v1.3$ und Nedd4-2 hervorgerufen wird, bedarf weiterer Untersuchung. Durch Koexpression von SGK zusammen mit Nedd4-2 und $\text{K}_v1.3$ wird die Inaktivierung wieder aufgehoben. Hierbei ist bekannt, dass Nedd4-2 von der SGK phosphoryliert und damit inaktiviert wird.

Die Ergebnisse zeigen, dass die SGK bei der renalen Elektrolytregulation eine Schlüsselrolle einnimmt, indem sie nicht nur den ENaC, sondern auch die Na^+/K^+ -ATPase und zusammen mit NHERF2 den ROMK reguliert. Die Einbeziehung von NHERF2 für die Stimulation des ROMK1 und Nedd4-2 für die Stimulation von $\text{K}_v1.3$ macht die Wirkung der SGK auf verschiedene Zielproteine unabhängig voneinander. Dieses könnte ein Hinweis darauf sein, wie die SGK spezifische Wirkungen trotz eines breiten Spektrums an regulierten Proteinen erzielt.

6 Literaturverzeichnis

1. Abdul M, Hoosein N. Expression and activity of potassium ion channels in human prostate cancer. *Cancer Lett* 2002; 186(1):99-105.
2. Abdul M, Hoosein N. Voltage-gated potassium ion channels in colon cancer. *Oncol Rep* 2002; 9(5):961-964.
3. Ahmad M, Medford RM. Evidence for the regulation of Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase alpha 1 gene expression through the interaction of aldosterone and cAMP-inducible transcriptional factors. *Steroids* 1995; 60(1):147-152.
4. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. Molecular Biology of the cell. 2 ed. New York, London: Garland Publishing, 2002.
5. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P et al. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 1996; 15(23):6541-6551.
6. Alliston TN, Maiyar AC, Buse P, Firestone GL, Richards JS. Follicle stimulating hormone-regulated expression of serum/glucocorticoid-inducible kinase in rat ovarian granulosa cells: a functional role for the Sp1 family in promoter activity. *Mol Endocrinol* 1997; 11(13):1934-1949.
7. Alvarez dIR, Zhang P, Naray-Fejes-Toth A, Fejes-Toth G, Canessa CM. The serum and glucocorticoid kinase sgk increases the abundance of epithelial sodium channels in the plasma membrane of *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 1999; 274(53):37834-37839.
8. Alvarez-Leefmans FJ. Extracellular reference electrodes. In: Grantyn R, Kettenmann H, editors. Practical Electrophysiological Methods: A guide for in vitro studies in vertebrate neurobiology. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore: John Wiley Sons Inc., 1992: 171-182.
9. Anan T, Nagata Y, Koga H, Honda Y, Yabuki N, Miyamoto C et al. Human ubiquitin-protein ligase Nedd4: expression, subcellular localization and selective interaction with ubiquitin-conjugating enzymes. *Genes Cells* 1998; 3(11):751-763.
10. Andrew RD. Seizure and acute osmotic change: clinical and neurophysiological aspects. *J Neurol Sci* 1991; 101(1):7-18.
11. Aperia A, Bertorello A, Seri I. Dopamine causes inhibition of Na⁺-K⁺-ATPase activity in rat proximal convoluted tubule segments. *Am J Physiol* 1987; 252(1 Pt 2):F39-F45.

12. Ashcroft FM. Ion Channels and Disease. 1 ed. San Diego: Academic press, 2000.
13. Asher C, Wald H, Rossier BC, Garty H. Aldosterone-induced increase in the abundance of Na⁺ channel subunits. *Am J Physiol* 1996; 271(2 Pt 1):C605-C611.
14. Beguin P, Beggah AT, Chibalin AV, Burgener-Kairuz P, Jaisser F, Mathews PM et al. Phosphorylation of the Na,K-ATPase alpha-subunit by protein kinase A and C in vitro and in intact cells. Identification of a novel motif for PKC-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* 1994; 269(39):24437-24445.
15. Beguin P, Wang X, Firsov D, Puoti A, Claeys D, Horisberger JD et al. The gamma subunit is a specific component of the Na,K-ATPase and modulates its transport function. *EMBO J* 1997; 16(14):4250-4260.
16. Bell LM, Leong ML, Kim B, Wang E, Park J, Hemmings BA et al. 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* 2000; 275(33):25262-25272.
17. Beltowski J, Wojcicka G. Regulation of renal tubular sodium transport by cardiac natriuretic peptides: two decades of research. *Med Sci Monit* 2002; 8(2):RA39-RA52.
18. Beron J, Mastroberardino L, Spillmann A, Verrey F. Aldosterone modulates sodium kinetics of Na,K-ATPase containing an alpha 1 subunit in A6 kidney cell epithelia. *Mol Biol Cell* 1995; 6(3):261-271.
19. Bertorello A, Aperia A. Inhibition of proximal tubule Na(+)-K(+)-ATPase activity requires simultaneous activation of DA1 and DA2 receptors. *Am J Physiol* 1990; 259(6 Pt 2):F924-F928.
20. Bertorello A, Aperia A. Short-term regulation of Na⁺,K(+)-ATPase activity by dopamine. *Am J Hypertens* 1990; 3(6 Pt 2):51S-54S.
21. Bertorello AM, Aperia A, Walaas SI, Nairn AC, Greengard P. Phosphorylation of the catalytic subunit of Na⁺,K(+)-ATPase inhibits the activity of the enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(24):11359-11362.
22. Bertorello AM, Hopfield JF, Aperia A, Greengard P. Inhibition by dopamine of (Na(+)+K+)ATPase activity in neostriatal neurons through D1 and D2 dopamine receptor synergism. *Nature* 1990; 347(6291):386-388.
23. Bhandari S. The pathophysiological and molecular basis of Bartter's and Gitelman's syndromes. *Postgrad Med J* 1999; 75(885):391-396.

24. Bhandari S, Hunter M. Inward rectifier renal potassium channel (ROMK), the low-conductance channels for potassium secretion. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13(12):3019-3023.
25. Bhandari S, Hunter M. Biophysical effects of pore mutations of ROMK1. *Clin Sci (Lond)* 2001; 101(2):121-130.
26. Bhandari S, Hunter M. Influences of the N- and C-termini of the distal nephron inward rectifier, ROMK. *Kidney Blood Press Res* 2001; 24(3):142-148.
27. Biondi RM, Kieloch A, Currie RA, Deak M, Alessi DR. The PIF-binding pocket in PDK1 is essential for activation of S6K and SGK, but not PKB. *EMBO J* 2001; 20(16):4380-4390.
28. Blanco G, Mercer RW. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol* 1998; 275(5 Pt 2):F633-F650.
29. Blanco G, Sanchez G, Mercer RW. Differential regulation of Na,K-ATPase isozymes by protein kinases and arachidonic acid. *Arch Biochem Biophys* 1998; 359(2):139-150.
30. Blot-Chabaud M, Coutry N, Laplace M, Bonvalet J, Farman N. Role of protein phosphatase in the regulation of Na⁺-K⁺-ATPase by vasopressin in the cortical collecting duct. *J Membr Biol* 1996; 153(3):233-239.
31. Bohmer C, Wagner CA, Beck S, Moschen I, Melzig J, Werner A et al. The shrinkage-activated Na(+) conductance of rat hepatocytes and its possible correlation to rENaC. *Cell Physiol Biochem* 2000; 10(4):187-194.
32. Boim MA, Ho K, Shuck ME, Bienkowski MJ, Block JH, Slightom JL et al. ROMK inwardly rectifying ATP-sensitive K⁺ channel. II. Cloning and distribution of alternative forms. *Am J Physiol* 1995; 268(6 Pt 2):F1132-F1140.
33. Braughler JM, Corder CN. Reversible inactivation of purified (Na⁺ + K⁺)-ATPase from human renal tissue by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Biochim Biophys Acta* 1978; 524(2):455-465.
34. Braun GS, Huber SM. Development of renal funktion. *Zoology* 2002; 105:341-354.
35. Brennan FE, Fuller PJ. Rapid upregulation of serum and glucocorticoid-regulated kinase (sgk) gene expression by corticosteroids in vivo. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 166(2):129-136.
36. Brunet A, Park J, Tran H, Hu LS, Hemmings BA, Greenberg ME. Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead

- transcription factor FKHL1 (FOXO3a). *Mol Cell Biol* 2001; 21(3):952-965.
37. Buhagiar KA, Hansen PS, Gray DF, Mihailidou AS, Rasmussen HH. Angiotensin regulates the selectivity of the Na⁺-K⁺ pump for intracellular Na⁺. *Am J Physiol* 1999; 277(3 Pt 1):C461-C468.
 38. Busjahn A, Aydin A, Uhlmann R, Krasko C, Bähring S, Szelestei T et al. Serum- and glucocorticoid-regulated kinase (SGK1) gene and blood pressure. *Hypertension* 2002; 40(3):256-260.
 39. Butenschon I, Moller K, Hansel W. Angular methoxy-substituted furo- and pyranoquinolinones as blockers of the voltage-gated potassium channel Kv1.3. *J Med Chem* 2001; 44(8):1249-1256.
 40. Cahalan MD, Chandy KG, Decoursey TE, Gupta S, Lewis RS, Sutro JB. Ion channels in T lymphocytes. *Adv Exp Med Biol* 1987; 213:85-101.
 41. Carranza ML, Rousselot M, Chibalin AV, Bertorello AM, Favre H, Feraille E. Protein kinase A induces recruitment of active Na⁺,K⁺-ATPase units to the plasma membrane of rat proximal convoluted tubule cells. *J Physiol* 1998; 511 (Pt 1):235-243.
 42. Catterall WA. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu Rev Biochem* 1995; 64:493-531.
 43. Chen SY, Bhargava A, Mastroberardino L, Meijer OC, Wang J, Buse P et al. Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(5):2514-2519.
 44. Cheng SX, Aizman O, Nairn AC, Greengard P, Aperia A. [Ca²⁺]_i determines the effects of protein kinases A and C on activity of rat renal Na⁺,K⁺-ATPase. *J Physiol* 1999; 518 (Pt 1):37-46.
 45. Cheng XJ, Fisone G, Aizman O, Aizman R, Levenson R, Greengard P et al. PKA-mediated phosphorylation and inhibition of Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase in response to beta-adrenergic hormone. *Am J Physiol* 1997; 273(3 Pt 1):C893-C901.
 46. Chibalin AV, Vasilets LA, Hennekes H, Pralong D, Geering K. Phosphorylation of Na,K-ATPase alpha-subunits in microsomes and in homogenates of Xenopus oocytes resulting from the stimulation of protein kinase A and protein kinase C. *J Biol Chem* 1992; 267(31):22378-22384.
 47. Chittajallu R, Chen Y, Wang H, Yuan X, Ghiani CA, Heckman T et al. Regulation of Kv1 subunit expression in oligodendrocyte progenitor cells and their role in G1/S phase progression of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(4):2350-2355.

48. Chung S, Lee J, Joe EH, Uhm DY. Beta-amyloid peptide induces the expression of voltage dependent outward rectifying K⁺ channels in rat microglia. *Neurosci Lett* 2001; 300(2):67-70.
49. Clausen T. The Na⁺, K⁺ pump in skeletal muscle: quantification, regulation and functional significance. *Acta Physiol Scand* 1996; 156(3):227-235.
50. Cohen SN, Chang AC, Hsu L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972; 69(8):2110-2114.
51. Cook KK, Fadoo DA. Two adaptor proteins differentially modulate the phosphorylation and biophysics of Kv1.3 ion channel by SRC kinase. *J Biol Chem* 2002; 277(15):13268-13280.
52. Cougnon M, Benammou S, Brouillard F, Hulin P, Planelles G. Effect of reactive oxygen species on NH₄⁺ permeation in *Xenopus laevis* oocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282(6):C1445-C1453.
53. Cowling RT, Birnboim HC. Expression of serum- and glucocorticoid-regulated kinase (sgk) mRNA is up-regulated by GM-CSF and other proinflammatory mediators in human granulocytes. *J Leukoc Biol* 2000; 67(2):240-248.
54. Cox RH, Folander K, Swanson R. Differential expression of voltage-gated K(+) channel genes in arteries from spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Hypertension* 2001; 37(5):1315-1322.
55. Crambert G, Hasler U, Beggah AT, Yu C, Modyanov NN, Horisberger JD et al. Transport and pharmacological properties of nine different human Na, K-ATPase isozymes. *J Biol Chem* 2000; 275(3):1976-1986.
56. Dai F, Yu L, He H, Zhao Y, Yang J, Zhang X et al. Cloning and mapping of a novel human serum/glucocorticoid regulated kinase-like gene, SGKL, to chromosome 8q12.3-q13.1. *Genomics* 1999; 62(1):95-97.
57. Dascal N. The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit Rev Biochem* 1987; 22(4):317-387.
58. Davies AM, Batchelor TJ, Eardley I, Beech DJ. Potassium channel KV alpha1 subunit expression and function in human detrusor muscle. *J Urol* 2002; 167(4):1881-1886.
59. Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 2000; 351(Pt 1):95-105.

60. Dawid IB, Haynes SR, Jamrich M, Jonas E, Miyatani S, Sargent TD et al. Gene expression in *Xenopus* embryogenesis. *J Embryol Exp Morphol* 1985; 89 Suppl:113-124.
61. Dawid IB, Sargent TD. *Xenopus laevis* in developmental and molecular biology. *Science* 1988; 240(4858):1443-1448.
62. Debonneville C, Flores SY, Kamynina E, Plant PJ, Tauxe C, Thomas MA et al. Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na(+) channel cell surface expression. *EMBO J* 2001; 20(24):7052-7059.
63. Delmolino LM, Castellot JJ, Jr. Heparin suppresses sgk, an early response gene in proliferating vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 1997; 173(3):371-379.
64. Derrickson BH, Mandel LJ. Parathyroid hormone inhibits Na(+)-K(+)-ATPase through Gq/G11 and the calcium-independent phospholipase A2. *Am J Physiol* 1997; 272(6 Pt 2):F781-F788.
65. Dietzel ID, Bruns D, Polder HR, Lux HD. Voltage clamp recording. In: Grantyn R, Kettenmann H, editors. Practical Electrophysiological Methods: A guide for in vitro studies in vertebrate neurobiology. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore: John Wiley Sons Inc., 1992: 256-262.
66. Doi T, Fakler B, Schultz JH, Schulte U, Brandle U, Weidemann S et al. Extracellular K⁺ and intracellular pH allosterically regulate renal Kir1.1 channels. *J Biol Chem* 1996; 271(29):17261-17266.
67. Doucet A. Function and control of Na-K-ATPase in single nephron segments of the mammalian kidney. *Kidney Int* 1988; 34(6):749-760.
68. Dumont JN. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* 1972; 136(2):153-179.
69. Dunbar LA, Caplan MJ. Ion pumps in polarized cells: sorting and regulation of the Na⁺, K⁺ and H⁺, K⁺-ATPases. *J Biol Chem* 2001; 276(32):29617-29620.
70. Eckstein-Ludwig U, Rettinger J, Vasilets LA, Schwarz W. Voltage-dependent inhibition of the Na⁺,K⁺ pump by tetraethylammonium. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1372(2):289-300.
71. Efendiev R, Bertorello AM, Pedemonte CH. PKC-beta and PKC-zeta mediate opposing effects on proximal tubule Na⁺,K⁺-ATPase activity. *FEBS Lett* 1999; 456(1):45-48.
72. Efendiev R, Bertorello AM, Pressley TA, Rousselot M, Feraille E, Pedemonte CH. Simultaneous phosphorylation of Ser11 and Ser18 in

- the alpha-subunit promotes the recruitment of Na(+),K(+)-ATPase molecules to the plasma membrane. *Biochemistry* 2000; 39(32):9884-9892.
73. Embark HM, Bohmer C, Vallon V, Luft F, Lang F. Regulation of KCNE1-dependent K(+) current by the serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) isoforms. *Pflugers Arch* 2003; 445(5):601-606.
 74. Ewart HS, Klip A. Hormonal regulation of the Na(+)-K(+)-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. *Am J Physiol* 1995; 269(2 Pt 1):C295-C311.
 75. Farr TJ, Coddington-Lawson SJ, Snyder PM, McDonald FJ. Human Nedd4 interacts with the human epithelial Na⁺ channel: WW3 but not WW1 binds to Na⁺-channel subunits. *Biochem J* 2000; 345 Pt 3:503-509.
 76. Feraille E, Beguin P, Carranza ML, Gonin S, Rousselot M, Martin PY et al. Is phosphorylation of the alpha1 subunit at Ser-16 involved in the control of Na,K-ATPase activity by phorbol ester-activated protein kinase C? *Mol Biol Cell* 2000; 11(1):39-50.
 77. Feraille E, Carranza ML, Gonin S, Beguin P, Pedemonte C, Rousselot M et al. Insulin-induced stimulation of Na⁺,K(+)-ATPase activity in kidney proximal tubule cells depends on phosphorylation of the alpha-subunit at Tyr-10. *Mol Biol Cell* 1999; 10(9):2847-2859.
 78. Feraille E, Carranza ML, Rousselot M, Favre H. Insulin enhances sodium sensitivity of Na-K-ATPase in isolated rat proximal convoluted tubule. *Am J Physiol* 1994; 267(1 Pt 2):F55-F62.
 79. Feraille E, Rousselot M, Rajerison R, Favre H. Effect of insulin on Na⁺,K(+)-ATPase in rat collecting duct. *J Physiol* 1995; 488 (Pt 1):171-180.
 80. Ferrandi M, Salardi S, Tripodi G, Barassi P, Rivera R, Manunta P et al. Evidence for an interaction between adducin and Na(+)-K(+)-ATPase: relation to genetic hypertension. *Am J Physiol* 1999; 277(4 Pt 2):H1338-H1349.
 81. Festy F, Robert JC, Brasseur R, Thomas A. Interaction between the N-terminal domain of gastric H,K-ATPase and the spectrin binding domain of ankyrin III. *J Biol Chem* 2001; 276(11):7721-7726.
 82. Fillon S, Klingel K, Warntges S, Sauter M, Gabrysch S, Pestel S et al. Expression of the serine/threonine kinase hSGK1 in chronic viral hepatitis. *Cell Physiol Biochem* 2002; 12(1):47-54.
 83. Fillon S, Warntges S, Matskevitch J, Moschen I, Setiawan I, Gamper N et al. Serum- and glucocorticoid-dependent kinase, cell volume, and the

- regulation of epithelial transport. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001; 130(3):367-376.
84. Fisone G, Snyder GL, Aperia A, Greengard P. Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase phosphorylation in the choroid plexus: synergistic regulation by serotonin/protein kinase C and isoproterenol/cAMP-PK/PP-1 pathways. *Mol Med* 1998; 4(4):258-265.
85. Fotis H, Tatjanenko LV, Vasilets LA. Phosphorylation of the alpha-subunits of the Na⁺/K⁺-ATPase from mammalian kidneys and *Xenopus* oocytes by cGMP-dependent protein kinase results in stimulation of ATPase activity. *Eur J Biochem* 1999; 260(3):904-910.
86. Gamper N, Fillon S, Huber SM, Feng Y, Kobayashi T, Cohen P et al. IGF-1 up-regulates K⁺ channels via PI3-kinase, PDK1 and SGK1. *Pflugers Arch* 2002; 443(4):625-634.
87. Gao J, Cohen IS, Mathias RT, Baldo GJ. Regulation of the beta-stimulation of the Na⁽⁺⁾-K⁺ pump current in guinea-pig ventricular myocytes by a cAMP-dependent PKA pathway. *J Physiol* 1994; 477 (Pt 3):373-380.
88. Gao J, Wymore R, Wymore RT, Wang Y, McKinnon D, Dixon JE et al. Isoform-specific regulation of the sodium pump by alpha- and beta-adrenergic agonists in the guinea-pig ventricle. *J Physiol* 1999; 516 (Pt 2):377-383.
89. Geering K. Subunit assembly and functional maturation of Na,K-ATPase. *J Membr Biol* 1990; 115(2):109-121.
90. Geering K, Theulaz I, Verrey F, Hauptle MT, Rossier BC. A role for the beta-subunit in the expression of functional Na⁺-K⁺-ATPase in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol* 1989; 257(5 Pt 1):C851-C858.
91. Giebisch G. Renal potassium transport: mechanisms and regulation. *Am J Physiol* 1998; 274(5 Pt 2):F817-F833.
92. Giebisch G. Physiological roles of renal potassium channels. *Semin Nephrol* 1999; 19(5):458-471.
93. Giebisch G, Wang W. Renal tubule potassium channels: function, regulation and structure. *Acta Physiol Scand* 2000; 170(2):153-173.
94. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 2002; 82(2):373-428.
95. Gloor SM. Relevance of Na,K-ATPase to local extracellular potassium homeostasis and modulation of synaptic transmission. *FEBS Lett* 1997; 412(1):1-4.

96. Gonzalez-Robayna IJ, Falender AE, Ochsner S, Firestone GL, Richards JS. Follicle-Stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-Induced kinase (Sgk): evidence for A kinase-independent signaling by FSH in granulosa cells. *Mol Endocrinol* 2000; 14(8):1283-1300.
97. Gulbins E, Szabo I, Baltzer K, Lang F. Ceramide-induced inhibition of T lymphocyte voltage-gated potassium channel is mediated by tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(14):7661-7666.
98. Gurdon JB. Introductory comments: *Xenopus* as a laboratory animal. In: Tinsley R, Kobel H, editors. *The biology of Xenopus*. Clarendon press, 1996: 3-6.
99. Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR, Marbaix G. Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* 1971; 233(5316):177-182.
100. Hamlyn JM, Blaustein MP, Bova S, DuCharme DW, Harris DW, Mandel F et al. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(14):6259-6263.
101. Hasler U, Wang X, Crambert G, Beguin P, Jaisser F, Horisberger JD et al. Role of beta-subunit domains in the assembly, stable expression, intracellular routing, and functional properties of Na,K-ATPase. *J Biol Chem* 1998; 273(46):30826-30835.
102. Hayashi M, Tapping RI, Chao TH, Lo JF, King CC, Yang Y et al. BMK1 mediates growth factor-induced cell proliferation through direct cellular activation of serum and glucocorticoid-inducible kinase. *J Biol Chem* 2001; 276(12):8631-8634.
103. Hille B. *Ionic channels of excitable membranes*. 2 ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc., 1992.
104. Ho K, Nichols CG, Lederer WJ, Lytton J, Vassilev PM, Kanazirska MV et al. Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* 1993; 362(6415):31-38.
105. Honore E, Attali B, Romey G, Lesage F, Barhanin J, Lazdunski M. Different types of K⁺ channel current are generated by different levels of a single mRNA. *EMBO J* 1992; 11(7):2465-2471.
106. Horisberger JD, Jaunin P, Good PJ, Rossier BC, Geering K. Coexpression of alpha 1 with putative beta 3 subunits results in functional Na⁺/K⁺ pumps in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(19):8397-8400.

107. Horwitz BA, Eaton M. The effect of adrenergic agonists and cyclic AMP on the Na⁺/K⁺ ATPase activity of brown adipose tissue. *Eur J Pharmacol* 1975; 34(1):241-245.
108. Hunter M. Accessory to kidney disease. *Nature* 2001; 414(6863):502-503.
109. Hussain T, Lokhandwala MF. Renal dopamine receptor function in hypertension. *Hypertension* 1998; 32(2):187-197.
110. Ikeda U, Hyman R, Smith TW, Medford RM. Aldosterone-mediated regulation of Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase gene expression in adult and neonatal rat cardiocytes. *J Biol Chem* 1991; 266(18):12058-12066.
111. Imaizumi K, Tsuda M, Wanaka A, Tohyama M, Takagi T. 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* 1994; 26(1-2):189-196.
112. Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, Schuler G, Moore T, Lee JC et al. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science* 1999; 283(5398):83-87.
113. Jacob A, Hurley IR, Goodwin LO, Cooper GW, Benoff S. Molecular characterization of a voltage-gated potassium channel expressed in rat testis. *Mol Hum Reprod* 2000; 6(4):303-313.
114. Jaisser F, Jaunin P, Geering K, Rossier BC, Horisberger JD. Modulation of the Na,K-pump function by beta subunit isoforms. *J Gen Physiol* 1994; 103(4):605-623.
115. Jaunin P, Horisberger JD, Richter K, Good PJ, Rossier BC, Geering K. Processing, intracellular transport, and functional expression of endogenous and exogenous alpha-beta 3 Na,K-ATPase complexes in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 1992; 267(1):577-585.
116. Jolliffe CN, Harvey KF, Haines BP, Parasivam G, Kumar S. Identification of multiple proteins expressed in murine embryos as binding partners for the WW domains of the ubiquitin-protein ligase Nedd4. *Biochem J* 2000; 351 Pt 3:557-565.
117. Kamynina E, Debonneville C, Bens M, Vandewalle A, Staub O. A novel mouse Nedd4 protein suppresses the activity of the epithelial Na⁺ channel. *FASEB J* 2001; 15(1):204-214.
118. Kamynina E, Debonneville C, Hirt RP, Staub O. Liddle's syndrome: a novel mouse Nedd4 isoform regulates the activity of the epithelial Na⁽⁺⁾ channel. *Kidney Int* 2001; 60(2):466-471.

119. Kanelis V, Rotin D, Forman-Kay JD. Solution structure of a Nedd4 WW domain-ENaC peptide complex. *Nat Struct Biol* 2001; 8(5):407-412.
120. Khanna R, Roy L, Zhu X, Schlichter LC. K⁺ channels and the microglial respiratory burst. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280(4):C796-C806.
121. Kim JW, Lee Y, Lee IA, Kang HB, Choe YK, Choe IS. Cloning and expression of human cDNA encoding Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase gamma-subunit. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1350(2):133-135.
122. Klingel K, Warntges S, Bock J, Wagner CA, Sauter M, Waldegger S et al. Expression of cell volume-regulated kinase h-sgk in pancreatic tissue. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279(5):G998-G1002.
123. Klinker R, Silbernagl S. Lehrbuch der Physiologie. 2 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2000.
124. Kobayashi T, Cohen P. 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* 1999; 339 (Pt 2):319-328.
125. Kobayashi T, Deak M, Morrice N, Cohen P. Characterization of the structure and regulation of two novel isoforms of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase. *Biochem J* 1999; 344 Pt 1:189-197.
126. Korovkina VP, England SK. Molecular diversity of vascular potassium channel isoforms. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002; 29(4):317-323.
127. Kotecha SA, Schlichter LC. A Kv1.5 to Kv1.3 switch in endogenous hippocampal microglia and a role in proliferation. *J Neurosci* 1999; 19(24):10680-10693.
128. Kumar JM, Brooks DP, Olson BA, Laping NJ. Sgk, a putative serine/threonine kinase, is differentially expressed in the kidney of diabetic mice and humans. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10(12):2488-2494.
129. Kunzelmann K, Hubner M, Vollmer M, Ruf R, Hildebrandt F, Greger R et al. A Bartter's syndrome mutation of ROMK1 exerts dominant negative effects on K⁽⁺⁾ conductance. *Cell Physiol Biochem* 2000; 10(3):117-124.
130. Kupper J, Prinz AA, Fromherz P. Recombinant Kv1.3 potassium channels stabilize tonic firing of cultured rat hippocampal neurons. *Pflugers Arch* 2002; 443(4):541-547.
131. Kuryshev YA, Wible BA, Gudz TI, Ramirez AN, Brown AM. KChAP/Kvbeta1.2 interactions and their effects on cardiac Kv channel expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 281(1):C290-C299.

132. Lang F, Cohen P. Regulation and physiological roles of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase isoforms. *Sci STKE* 2001; 2001(108):RE17.
133. Lang F, Klingel K, Wagner CA, Stegen C, Warntges S, Friedrich B et al. Deranged transcriptional regulation of cell-volume-sensitive kinase hSGK in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(14):8157-8162.
134. Laredo J, Hamilton BP, Hamlyn JM. Ouabain is secreted by bovine adrenocortical cells. *Endocrinology* 1994; 135(2):794-797.
135. Leong ML, Maiyar AC, Kim B, O'Keeffe BA, Firestone GL. 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* 2003; 278(8):5871-5882.
136. Levitan ES, Takimoto K. Dynamic regulation of K⁺ channel gene expression in differentiated cells. *J Neurobiol* 1998; 37(1):60-68.
137. Lewis RS, Cahalan MD. Potassium and calcium channels in lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 1995; 13:623-653.
138. Li D, Sweeney G, Wang Q, Klip A. Participation of PI3K and atypical PKC in Na⁺-K⁺-pump stimulation by IGF-I in VSMC. *Am J Physiol* 1999; 276(6 Pt 2):H2109-H2116.
139. Li D, Takimoto K, Levitan ES. Surface expression of Kv1 channels is governed by a C-terminal motif. *J Biol Chem* 2000; 275(16):11597-11602.
140. Li KX, Sperelakis N. Isoproterenol- and insulin-induced hyperpolarization in rat skeletal muscle. *J Cell Physiol* 1993; 157(3):631-636.
141. Litchfield WR, Dluhy RG, Lifton RP, Rich GM. Glucocorticoid-remediable aldosteronism. *Compr Ther* 1995; 21(10):553-558.
142. Liu D, Yang X, Songyang Z. Identification of CISK, a new member of the SGK kinase family that promotes IL-3-dependent survival. *Curr Biol* 2000; 10(19):1233-1236.
143. Loffing J, Zecevic M, Feraille E, Kaissling B, Asher C, Rossier BC et al. Aldosterone induces rapid apical translocation of ENaC in early portion of renal collecting system: possible role of SGK. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280(4):F675-F682.
144. Lopina OD. Interaction of Na,K-ATPase catalytic subunit with cellular proteins and other endogenous regulators. *Biochemistry (Mosc)* 2001; 66(10):1122-1131.

145. MacKinnon R. Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* 1991; 350(6315):232-235.
146. Manabe I, Tsuboi M, Ahmmed GU, Sasaki N, Ohtahara A, Yamamoto Y et al. Expression of Shaker-type voltage-gated potassium channel genes in the guinea-pig. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1998; 99(1):33-40.
147. Martin-Vasallo P, Dackowski W, Emanuel JR, Levenson R. Identification of a putative isoform of the Na,K-ATPase beta subunit. Primary structure and tissue-specific expression. *J Biol Chem* 1989; 264(8):4613-4618.
148. Matsuda H. Magnesium gating of the inwardly rectifying K⁺ channel. *Annu Rev Physiol* 1991; 53:289-298.
149. Matsuoka Y, Li X, Bennett V. Adducin: structure, function and regulation. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57(6):884-895.
150. Maunsbach AB, Skriver E, Jorgensen PL. Analysis of Na⁺,K⁺-ATPase by electron microscopy. *Methods Enzymol* 1988; 156:430-441.
151. McCormack K, McCormack T, Tanouye M, Rudy B, Stuhmer W. Alternative splicing of the human Shaker K⁺ channel beta 1 gene and functional expression of the beta 2 gene product. *FEBS Lett* 1995; 370(1-2):32-36.
152. McCormack T, McCormack K, Nadal MS, Vieira E, Ozaita A, Rudy B. The effects of Shaker beta-subunits on the human lymphocyte K⁺ channel Kv1.3. *J Biol Chem* 1999; 274(29):20123-20126.
153. McDonough AA, Geering K, Farley RA. The sodium pump needs its beta subunit. *FASEB J* 1990; 4(6):1598-1605.
154. McKee M, Scavone C, Nathanson JA. Nitric oxide, cGMP, and hormone regulation of active sodium transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(25):12056-12060.
155. Mense M, Dunbar LA, Blostein R, Caplan MJ. Residues of the fourth transmembrane segments of the Na,K-ATPase and the gastric H,K-ATPase contribute to cation selectivity. *J Biol Chem* 2000; 275(3):1749-1756.
156. Mikosz CA, Brickley DR, Sharkey MS, Moran TW, Conzen SD. Glucocorticoid receptor-mediated protection from apoptosis is associated with induction of the serine/threonine survival kinase gene, *sgk-1*. *J Biol Chem* 2001; 276(20):16649-16654.
157. Minor NT, Sha Q, Nichols CG, Mercer RW. The gamma subunit of the Na,K-ATPase induces cation channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(11):6521-6525.

158. Mizuno H, Nishida E. The ERK MAP kinase pathway mediates induction of SGK (serum- and glucocorticoid-inducible kinase) by growth factors. *Genes Cells* 2001; 6(3):261-268.
159. Moral Z, Dong K, Wei Y, Sterling H, Deng H, Ali S et al. Regulation of ROMK1 channels by protein-tyrosine kinase and -tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* 2001; 276(10):7156-7163.
160. Muto S. Potassium transport in the mammalian collecting duct. *Physiol Rev* 2001; 81(1):85-116.
161. Naray-Fejes-Toth A, Canessa C, Cleaveland ES, Aldrich G, Fejes-Toth G. sgk is an aldosterone-induced kinase in the renal collecting duct. Effects on epithelial na⁺ channels. *J Biol Chem* 1999; 274(24):16973-16978.
162. Naray-Fejes-Toth A, Fejes-Toth G. The sgk, an aldosterone-induced gene in mineralocorticoid target cells, regulates the epithelial sodium channel. *Kidney Int* 2000; 57(4):1290-1294.
163. Nelson WJ, Hammerton RW. A membrane-cytoskeletal complex containing Na⁺,K⁺-ATPase, ankyrin, and fodrin in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells: implications for the biogenesis of epithelial cell polarity. *J Cell Biol* 1989; 108(3):893-902.
164. Nelson WJ, Hammerton RW, McNeill H. Role of the membrane-cytoskeleton in the spatial organization of the Na,K-ATPase in polarized epithelial cells. *Soc Gen Physiol Ser* 1991; 46:77-87.
165. Nelson WJ, Veshnock PJ. Ankyrin binding to (Na⁺ + K⁺)ATPase and implications for the organization of membrane domains in polarized cells. *Nature* 1987; 328(6130):533-536.
166. Nemoto J, Muto S, Ohtaka A, Kawakami K, Asano Y. Serum transcriptionally regulates Na(+)-K(+)-ATPase gene expression in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1997; 273(3 Pt 1):C1088-C1099.
167. O'Brien SE, Apkon M, Berul CI, Patel HT, Saupe K, Spindler M et al. Phenotypical features of long Q-T syndrome in transgenic mice expressing human Na-K-ATPase alpha(3)-isoform in hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279(5):H2133-H2142.
168. O'Neil RG. Aldosterone regulation of sodium and potassium transport in the cortical collecting duct. *Semin Nephrol* 1990; 10(4):365-374.
169. Oguchi A, Ikeda U, Kanbe T, Tsuruya Y, Yamamoto K, Kawakami K et al. Regulation of Na-K-ATPase gene expression by aldosterone in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1993; 265(4 Pt 2):H1167-H1172.

170. Ohlemeyer C, Meyer JW. The Faraday cage and grounding arrangements. In: Grantyn R, Kettenmann H, editors. *Practical Electrophysiological Methods: A guide for in vitro studies in vertebrate neurobiology*. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore: John Wiley Sons Inc., 1992: 3-5.
171. Oishi K, Zheng B, Kuo JF. Inhibition of Na,K-ATPase and sodium pump by protein kinase C regulators sphingosine, lysophosphatidylcholine, and oleic acid. *J Biol Chem* 1990; 265(1):70-75.
172. Ouadid-Ahidouch H, Chaussade F, Roudbaraki M, Slomianny C, Dewailly E, Delcourt P et al. KV1.1 K(+) channels identification in human breast carcinoma cells: involvement in cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 278(2):272-277.
173. Palmer LG. Potassium secretion and the regulation of distal nephron K channels. *Am J Physiol* 1999; 277(6 Pt 2):F821-F825.
174. Panyi G, Deutsch C. Assembly and suppression of endogenous Kv1.3 channels in human T cells. *J Gen Physiol* 1996; 107(3):409-420.
175. Park J, Leong ML, Buse P, Maiyar AC, Firestone GL, Hemmings BA. Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway. *EMBO J* 1999; 18(11):3024-3033.
176. Pearce D. SGK1 Regulation of Epithelial Sodium Transport. *Cell Physiol Biochem* 2003; 13(13):20.
177. Pearce D, Verrey F, Chen SY, Mastroberardino L, Meijer OC, Wang J et al. Role of SGK in mineralocorticoid-regulated sodium transport. *Kidney Int* 2000; 57(4):1283-1289.
178. Perrotti N, He RA, Phillips SA, Haft CR, Taylor SI. Activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase (Sgk) by cyclic AMP and insulin. *J Biol Chem* 2001; 276(12):9406-9412.
179. Pfeiffer R, Beron J, Verrey F. Regulation of Na⁺ pump function by aldosterone is alpha-subunit isoform specific. *J Physiol* 1999; 516 (Pt 3):647-655.
180. Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 2001; 70:503-533.
181. Pollard TD, Earnshaw WC. *Cell Biology*. Philadelphia: Elsevier Science, 2002.
182. Pollock NS, Ferguson SC, McFarlane S. Expression of voltage-dependent potassium channels in the developing visual system of *Xenopus laevis*. *J Comp Neurol* 2002; 452(4):381-391.

183. Pontiggia L, Winterhalter K, Gloor SM. Inhibition of Na,K-ATPase activity by cGMP is isoform-specific in brain endothelial cells. *FEBS Lett* 1998; 436(3):466-470.
184. Rakowski RF, Vasilets LA, LaTona J, Schwarz W. A negative slope in the current-voltage relationship of the Na⁺/K⁺ pump in *Xenopus* oocytes produced by reduction of external [K⁺]. *J Membr Biol* 1991; 121(2):177-187.
185. Richards JS, Sharma SC, Falender AE, Lo YH. Expression of FKHR, FKHL1, and AFX genes in the rodent ovary: evidence for regulation by IGF-I, estrogen, and the gonadotropins. *Mol Endocrinol* 2002; 16(3):580-599.
186. Rotin D. Regulation of the epithelial sodium channel (ENaC) by accessory proteins. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000; 9(5):529-534.
187. Ruppertsberg JP. Intracellular regulation of inward rectifier K⁺ channels. *Pflugers Arch* 2000; 441(1):1-11.
188. Salonikidis PS, Kirichenko SN, Tatjanenko LV, Schwarz W, Vasilets LA. Extracellular pH modulates kinetics of the Na⁽⁺⁾,K⁽⁺⁾-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1509(1-2):496-504.
189. Sambrook J, Fritsch EF, Manil J. Molecular cloning: A Laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
190. Satoh T, Cohen HT, Katz AI. Different mechanisms of renal Na-K-ATPase regulation by protein kinases in proximal and distal nephron. *Am J Physiol* 1993; 265(3 Pt 2):F399-F405.
191. Sayer JA, Pearce SH. Diagnosis and clinical biochemistry of inherited tubulopathies. *Ann Clin Biochem* 2001; 38(Pt 5):459-470.
192. Scavone C, Scanlon C, McKee M, Nathanson JA. Atrial natriuretic peptide modulates sodium and potassium-activated adenosine triphosphatase through a mechanism involving cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 272(3):1036-1043.
193. Schilling T, Quandt FN, Cherny VV, Zhou W, Heinemann U, Decoursey TE et al. Upregulation of Kv1.3 K⁽⁺⁾ channels in microglia deactivated by TGF-beta. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279(4):C1123-C1134.
194. Schmidt RF, Thews G, Lang F. Physiologie des Menschen. 28 ed. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 2000.
195. Schwarz W, Rettinger J. Foundations in Electrophysiology. 1 ed. Aachen: Shaker Verlag, 2000.

196. Segal AS, Yao X, Desir GV. The T0 domain of rabbit KV1.3 regulates steady state channel protein level. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 254(1):54-64.
197. Seok JH, Kim JB, Hong JH, Hur GM, Jeon JR, Lim K et al. Aldosterone stimulates Na,K-ATPase activity in basolateral membrane of rat kidney. *Biochem Mol Biol Int* 1998; 45(5):879-885.
198. Shahedi M, Laborde K, Bussieres L, Sachs C. Acute and early effects of aldosterone on Na-K-ATPase activity in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Am J Physiol* 1993; 264(6 Pt 2):F1021-F1026.
199. Shigaev A, Asher C, Latter H, Garty H, Reuveny E. Regulation of sgk by aldosterone and its effects on the epithelial Na(+) channel. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 278(4):F613-F619.
200. Shuck ME, Bock JH, Benjamin CW, Tsai TD, Lee KS, Slightom JL et al. Cloning and characterization of multiple forms of the human kidney ROM-K potassium channel. *J Biol Chem* 1994; 269(39):24261-24270.
201. Silbernagl S, Lang A. Taschenatlas der Physiologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2002.
202. Skou J. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral berve. *Biochim.Biophys.Acta* 1957 23, 394-401.
203. Smith D, Xu W, Varnold R. Oogenesis and oocyte isolation. In: Kay B, Peng H, editors. *Xenopus laevis: practical uses in cell and molecular biology*. Methods in Cell Biology. 1991: 45-60.
204. Sobko A, Peretz A, Shirihai O, Etkin S, Cherepanova V, Dagan D et al. Heteromultimeric delayed-rectifier K⁺ channels in schwann cells: developmental expression and role in cell proliferation. *J Neurosci* 1998; 18(24):10398-10408.
205. Soltoff SP, Mandel LJ. Active ion transport in the renal proximal tubule. II. Ionic dependence of the Na pump. *J Gen Physiol* 1984; 84(4):623-642.
206. Soltoff SP, Mandel LJ. Active ion transport in the renal proximal tubule. III. The ATP dependence of the Na pump. *J Gen Physiol* 1984; 84(4):643-662.
207. Staub O, Abriel H, Plant P, Ishikawa T, Kanelis V, Saleki R et al. Regulation of the epithelial Na⁺ channel by Nedd4 and ubiquitination. *Kidney Int* 2000; 57(3):809-815.
208. Staub O, Gautschi I, Ishikawa T, Breitschopf K, Ciechanover A, Schild L et al. Regulation of stability and function of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) by ubiquitination. *EMBO J* 1997; 16(21):6325-6336.

209. Storz P, Toker A. 3'-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK-1) in PI 3-kinase signaling. *Front Biosci* 2002; 7:d886-d902.
210. Summa V, Mordasini D, Roger F, Bens M, Martin PY, Vandewalle A et al. Short term effect of aldosterone on Na,K-ATPase cell surface expression in kidney collecting duct cells. *J Biol Chem* 2001; 276(50):47087-47093.
211. Sweeney G, Klip A. Regulation of the Na⁺/K⁺-ATPase by insulin: why and how? *Mol Cell Biochem* 1998; 182(1-2):121-133.
212. Sweeney G, Klip A. Mechanisms and consequences of Na⁺,K⁺-pump regulation by insulin and leptin. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* 2001; 47(2):363-372.
213. Sweeney G, Somwar R, Ramlal T, Martin-Vasallo P, Klip A. Insulin stimulation of K⁺ uptake in 3T3-L1 fibroblasts involves phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C-zeta. *Diabetologia* 1998; 41(10):1199-1204.
214. Takemoto F, Cohen HT, Satoh T, Katz AI. Dopamine inhibits Na/K-ATPase in single tubules and cultured cells from distal nephron. *Pflugers Arch* 1992; 421(4):302-306.
215. Tanneur V, Ilgaz D, Duranton C, Fillon S, Gamper N, Huber SM et al. Time-dependent regulation of capacitative Ca(2⁺) entry by IGF-1 in human embryonic kidney cells. *Pflugers Arch* 2002; 445(1):74-79.
216. Terlau H, Stuhmer W. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Naturwissenschaften* 1998; 85(9):437-444.
217. Therien AG, Blostein R. Mechanisms of sodium pump regulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279(3):C541-C566.
218. Therien AG, Goldshleger R, Karlisch SJ, Blostein R. Tissue-specific distribution and modulatory role of the gamma subunit of the Na,K-ATPase. *J Biol Chem* 1997; 272(51):32628-32634.
219. Therien AG, Karlisch SJ, Blostein R. Expression and functional role of the gamma subunit of the Na, K-ATPase in mammalian cells. *J Biol Chem* 1999; 274(18):12252-12256.
220. Therien AG, Nestor NB, Ball WJ, Blostein R. Tissue-specific versus isoform-specific differences in cation activation kinetics of the Na,K-ATPase. *J Biol Chem* 1996; 271(12):7104-7112.
221. Thompson CB, Dorup I, Ahn J, Leong PK, McDonough AA. Glucocorticoids increase sodium pump alpha(2)- and beta(1)-subunit abundance and mRNA in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280(3):C509-C516.

222. Tsai KJ, Chen SK, Ma YL, Hsu WL, Lee EH. *sgk*, a primary glucocorticoid-induced gene, facilitates memory consolidation of spatial learning in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(6):3990-3995.
223. Vallon V, Verkman AS, Schnermann J. Luminal hypotonicity in proximal tubules of aquaporin-1-knockout mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 278(6):F1030-F1033.
224. Vasilets LA, Omay HS, Ohta T, Noguchi S, Kawamura M, Schwarz W. Stimulation of the Na⁺/K⁺ pump by external [K⁺] is regulated by voltage-dependent gating. *J Biol Chem* 1991; 266(25):16285-16288.
225. Veh RW, Lichtinghagen R, Sewing S, Wunder F, Grumbach IM, Pongs O. Immunohistochemical localization of five members of the Kv1 channel subunits: contrasting subcellular locations and neuron-specific co-localizations in rat brain. *Eur J Neurosci* 1995; 7(11):2189-2205.
226. Vereninov AA, Vasil'eva IO, Iurinskaia VE, Matveev VV, Glushankova LN. [Study of "group" expression of mRNA of the ion transporters ATP1B1, NHE1 and NKCC1, beta-actin, glycerophosphate dehydrogenase, proteins regulating proliferation and apoptosis of p53, Bcl-2, IL-2 and hSGK kinase at the prereplicative stage of human lymphocyte activation]. *Tsitologija* 2001; 43(6):613-618.
227. Verrey F. Early aldosterone action: toward filling the gap between transcription and transport. *Am J Physiol* 1999; 277(3 Pt 2):F319-F327.
228. Verrey F, Loffing J, Zecevic M, Heitzmann D, Staub O. SGK1: Aldosterone-Induced Relay of Na⁺ Transport Regulation in Distal Kidney Nephron Cells. *Cell Physiol Biochem* 2003; 13(1):21-28.
229. Wade JB, Welling PA, Donowitz M, Shenolikar S, Weinman EJ. Differential renal distribution of NHERF isoforms and their colocalization with NHE3, ezrin, and ROMK. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280(1):C192-C198.
230. Wagner CA, Friedrich B, Setiawan I, Lang F, Broer S. The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. *Cell Physiol Biochem* 2000; 10(1-2):1-12.
231. Wagner CA, Ott M, Klingel K, Beck S, Melzig J, Friedrich B et al. Effects of the serine/threonine kinase SGK1 on the epithelial Na⁽⁺⁾ channel (ENaC) and CFTR: implications for cystic fibrosis. *Cell Physiol Biochem* 2001; 11(4):209-218.
232. Waldegger S, Barth P, Forrest JN, Jr., Greger R, Lang F. Cloning of *sgk* serine-threonine protein kinase from shark rectal gland - a gene induced

- by hypertonicity and secretagogues. *Pflugers Arch* 1998; 436(4):575-580.
233. Waldegger S, Barth P, Raber G, Lang F. 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* 1997; 94(9):4440-4445.
234. Waldegger S, Erdel M, Nagl UO, Barth P, Raber G, Steuer S et al. Genomic organization and chromosomal localization of the human SGK protein kinase gene. *Genomics* 1998; 51(2):299-302.
235. Waldegger S, Gabrysch S, Barth P, Fillon S, Lang F. h-sgk serine-threonine protein kinase as transcriptional target of p38/MAP kinase pathway in HepG2 human hepatoma cells. *Cell Physiol Biochem* 2000; 10(4):203-208.
236. Waldegger S, Klingel K, Barth P, Sauter M, Rfer ML, Kandolf R et al. h-sgk serine-threonine protein kinase gene as transcriptional target of transforming growth factor beta in human intestine. *Gastroenterology* 1999; 116(5):1081-1088.
237. Wang J, Barbry P, Maiyar AC, Rozansky DJ, Bhargava A, Leong M et al. SGK integrates insulin and mineralocorticoid regulation of epithelial sodium transport. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280(2):F303-F313.
238. Wang Y, Gao J, Mathias RT, Cohen IS, Sun X, Baldo GJ. alpha-Adrenergic effects on Na⁺-K⁺ pump current in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 1998; 509 (Pt 1):117-128.
239. Warntges S, Friedrich B, Henke G, Durantou C, Lang A, Waldegger S et al. Cerebral localization and regulation of the cell volume-sensitive serum- and glucocorticoid-dependent kinase SGK1. *Pflugers Arch* 2002; 443(4):617-624.
240. Weber WM. Endogenous ion channels in oocytes of xenopus laevis: recent developments. *J Membr Biol* 1999; 170(1):1-12.
241. Weber WM, Liebold KM, Clauss W. Amiloride-sensitive Na⁺ conductance in native Xenopus oocytes. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1239(2):201-206.
242. Weber WM, Liebold KM, Reifarth FW, Uhr U, Clauss W. Influence of extracellular Ca²⁺ on endogenous Cl⁻ channels in Xenopus oocytes. *Pflugers Arch* 1995; 429(6):820-824.
243. Weber WM, Schwarz W, Passow H. Endogenous D-glucose transport in oocytes of Xenopus laevis. *J Membr Biol* 1989; 111(1):93-102.

244. Webster MK, Goya L, Firestone GL. Immediate-early transcriptional regulation and rapid mRNA turnover of a putative serine/threonine protein kinase. *J Biol Chem* 1993; 268(16):11482-11485.
245. Webster MK, Goya L, Ge Y, Maiyar AC, Firestone GL. 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* 1993; 13(4):2031-2040.
246. Weinman EJ. New functions for the NHERF family of proteins. *J Clin Invest* 2001; 108(2):185-186.
247. Welling PA, Caplan M, Sutters M, Giebisch G. Aldosterone-mediated Na/K-ATPase expression is alpha 1 isoform specific in the renal cortical collecting duct. *J Biol Chem* 1993; 268(31):23469-23476.
248. Whorwood CB, Stewart PM. Transcriptional regulation of Na/K-ATPase by corticosteroids, glycyrrhetic acid and second messenger pathways in rat kidney epithelial cells. *J Mol Endocrinol* 1995; 15(1):93-103.
249. Wilson PD, Horster MF. Differential response to hormones of defined distal nephron epithelia in culture. *Am J Physiol* 1983; 244(3):C166-C174.
250. Wulff P, Vallon V, Huang DY, Volkl H, Yu F, Richter K et al. Impaired renal Na(+) retention in the sgk1-knockout mouse. *J Clin Invest* 2002; 110(9):1263-1268.
251. Yao X, Chang AY, Boulpaep EL, Segal AS, Desir GV. Molecular cloning of a glibenclamide-sensitive, voltage-gated potassium channel expressed in rabbit kidney. *J Clin Invest* 1996; 97(11):2525-2533.
252. Yeagle PL, Young J, Rice D. Effects of cholesterol on (Na⁺,K⁺)-ATPase ATP hydrolyzing activity in bovine kidney. *Biochemistry* 1988; 27(17):6449-6452.
253. Yoshimura SH, Vasilets LA, Ishii T, Takeyasu K, Schwarz W. The Na⁺,K⁺-ATPase carrying the carboxy-terminal Ca²⁺/calmodulin binding domain of the Ca²⁺ pump has 2Na⁺,2K⁺ stoichiometry and lost charge movement in Na⁺/Na⁺ exchange. *FEBS Lett* 1998; 425(1):71-74.
254. Yun CC. Concerted Roles of SGK1 and the Na⁺/H⁺ Exchanger Regulatory Factor 2 (NHERF2) in Regulation of NHE3. *Cell Physiol Biochem* 2003; 13(29):40.
255. Yun CC, Chen Y, Lang F. Glucocorticoid activation of Na(+)/H(+) exchanger isoform 3 revisited. The roles of SGK1 and NHERF2. *J Biol Chem* 2002; 277(10):7676-7683.

256. Yun CC, Palmada M, Embark HM, Fedorenko O, Feng Y, Henke G et al. 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* 2002; 13(12):2823-2830.
257. Yun CH, Lamprecht G, Forster DV, Sidor A. NHE3 kinase A regulatory protein E3KARP binds the epithelial brush border Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 and the cytoskeletal protein ezrin. *J Biol Chem* 1998; 273(40):25856-25863.
258. Yun CH, Oh S, Zizak M, Steplock D, Tsao S, Tse CM et al. cAMP-mediated inhibition of the epithelial brush border Na⁺/H⁺ exchanger, NHE3, requires an associated regulatory protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(7):3010-3015.
259. Zecevic M, Heitzmann D, Pearce D, Verrey F. Both apical (ENaC) and basolateral (Na,K ATPase) Na⁺ Transport Proteins are upregulated by SGK in in vitro systems. *Pflugers Arch. Suppl.* 443, 283. 15-3-2002. Abstract.
260. Zemanova Z, Pacha J. Localization of Na,K-ATPase activity in developing rat distal colon: role of corticosteroids. *Mech Ageing Dev* 1998; 101(1-2):129-143.

7 Anhang

7.1 Danksagung

Zunächst möchte ich natürlich meinem Doktorvater Prof. Florian Lang für die Überlassung des Themas und die Unterstützung dieser Arbeit danken. Durch seine Begeisterung und ausdauernde Begleitung konnte diese Arbeit erst entstehen. Weiterhin danke ich Herrn Prof. Klaus Dietz, dessen sorgfältige Beratung bei statistischen Problemen mir eine sehr große Hilfe war.

Mein ganz besonderer Dank gilt dem Team im Oozyten-Labor. Die tolle Stimmung und die interessanten und persönlichen Gespräche über Wissenschaft aber auch über „Gott und die Welt“ haben mir viel Freude gemacht. Iwan Setiawan danke ich für die Einführung in die elektrophysiologischen Methoden, Birgitta Noll für die vielen molekularbiologischen Arbeiten und die Einführung in die Oozyten-Präparation. Ihre humorvolle Art trug sehr viel zu der angenehmen Laboratmosphäre bei. Christoph Böhmer danke ich für die vielen technischen Erneuerungen und Hilfestellungen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Uwe Schüler, Peter Dürr und Jürgen Kahlke möchte ich für Tips und Hilfe bei technischen Problemen herzlich danken. Horst Apfel und Tanja Loch haben bei organisatorischen Dingen geholfen, wofür ich ihnen sehr dankbar bin.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Stefan Huber für seine geduldige, konstruktive Diskussion und für seine menschliche Art im Umgang miteinander.

Katrin Mehrrens hat mich bei dieser Arbeit lange und mit viel Ausdauer und Unterstützung begleitet, was ich nicht immer genügend zu schätzen wußte. Ich möchte ihr für Alles aus tiefem Herzen danken, verbunden mit dem Wunsch und der Hoffnung, daß wir beide auf dem richtigen Weg sind.

Nicht zuletzt gilt natürlich auch besonderer Dank Familie, Freunden und Bekannten, die Erfolgserlebnisse sowie Mißerfolge mit mir geteilt haben und so mit moralischer Unterstützung zu dieser Arbeit beigetragen haben.

7.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Guido Henke
Geburtsdatum	21.11.1970
Geburtsort	Schleswig
Eltern	Alfred Henke, Ruth Henke (geb. Kröplin)

Schulbildung

1977 – 1981	Grundschule Neuberend
1981 – 1990	Lornsenschule Schleswig, Gymnasium
	Abschluss: allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

6/1990 – 8/1991	Rettungsdienst des DRK – Kreisverband Schleswig
9/1990	Prüfung zum staatlich geprüften Rettungssanitäter

Studium/Beruf

10/1991 – 3/1992	Studium der Luft- u. Raumfahrttechnik an der Universität Stuttgart
6/1992 – 7/1999	Pflegehelfer in der Medizinischen Uni-Klinik Tübingen
6/1993 – 5/2000	Studium der Humanmedizin an der Universität Tübingen
4/1999 – 3/2000	Praktisches Jahr im Bürgerhospital Stuttgart in den Fächern Innere, Neurologie und Chirurgie
5/2000	Dritter Teil der Ärztlichen Prüfung
6/2000 – 1/2001	AIP in der Neurologischen Klinik am Bürgerhospital in Stuttgart
2/2001 – 2/2002	Forschungstätigkeit am Physiologischen Institut der Universität Tübingen
3/2002 – 12/2002	AIP in der nephrologischen Abteilung der Uni-Klinik Tübingen
1/2003	Forschungstätigkeit am Physiologischen Institut der Universität Tübingen
	Promotion mit der vorliegenden Arbeit

Publikationsverzeichnis

A. Originalpublikationen in referierten Journalen

1. Boehmer C, Wilhelm V, Palmada M, Wallisch S, Henke G, Brinkmeier H, Cohen P, Pieske B, Lang F. Serum and glucocorticoid inducible kinases in the regulation of the cardiac sodium channel SCN5A. *Cardiovasc Res* 2003; 57(4):1079-1084.
2. Lang F, Henke G, Embark HM, Waldegger S, Palmada M, Bohmer C, Vallon V. Regulation of channels by the serum and glucocorticoid-inducible kinase - implications for transport, excitability and cell proliferation. *Cell Physiol Biochem* 2003; 13(1):41-50.
3. Gamper N, Fillon S, Feng Y, Friedrich B, Lang PA, Henke G, Huber SM, Kobayashi T, Cohen P, Lang F. K(+) channel activation by all three isoforms of serum- and glucocorticoid-dependent protein kinase SGK. *Pflugers Arch* 2002; 445(1):60-66.
4. Henke G, Setiawan I, Bohmer C, Lang F. Activation of Na(+)/K(+)-ATPase by the Serum and Glucocorticoid-Dependent Kinase Isoforms. *Kidney Blood Press Res* 2002; 25(6):370-374.
5. Setiawan I, Henke G, Feng Y, Bohmer C, Vasilets LA, Schwarz W, Lang F. Stimulation of Xenopus oocyte Na(+),K(+)ATPase by the serum and glucocorticoid-dependent kinase sgk1. *Pflugers Arch* 2002; 444(3):426-431.
6. Warntges S, Friedrich B, Henke G, Durantou 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. Cerebral localization and regulation of the cell volume-sensitive serum- and glucocorticoid-dependent kinase SGK1. *Pflugers Arch* 2002; 443(4):617-624.
7. Yun CC, Palmada M, Embark HM, Fedorenko O, Feng Y, Henke G, Setiawan I, Boehmer C, Weinman EJ, Sandrasagra S, Korbmayer C, Cohen P, Pearce D, Lang F. 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* 2002; 13(12):2823-2830.
8. Henke G, Maier G, Wallisch S, Boehmer C, Lang F. 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*, in press.

B. Zitierbare Abstracts

1. Boehmer C, Wilhelm V, Palmada M, Wallisch S, Henke G, Brinkmeier H, Lang F. Serum and glucocorticoid inducible kinases in the regulation of the cardiac sodium channel SCN5A. *Pflugers Arch* 2003; 445(Suppl1). *Abstract*.
2. Dieter M, Henke G, Boehmer C, Waldegger S, Lang F. Regulation of the chloride channel CIC2 by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and the serum and glucocorticoid dependent kinase SGK1. *Pflugers Arch* 2003; 445(Suppl1). *Abstract*.
3. Henke G, Embark HM, Boehmer C, Lang F. Regulation of KCNE1/KCNQ1 dependent K⁺ current by the serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) isoforms SGK1, SGK2 and SGK3. *Pflugers Arch* 2003; 445(Suppl1). *Abstract*.
4. Huber SM, Henke G, Durantou C, Shumilina E, Tanneur V, Sandu C, Brand V, van de Sand C, Heussler V, Lang F. Plasmodium induces swelling-activated CIC-2 anion channels in the host erythrocyte. *Pflugers Arch* 2003; 445(Suppl1). *Abstract*.
5. Kostelac K, Henke G, Boehmer C, Broer S, Lang F. The kinase SGK1 regulates the glutamate transporter EAAT3. *Pflugers Arch* 2003; 445(Suppl1). *Abstract*.
6. Maier G, Henke G, Boehmer C, Lang F. Regulation of the voltage gated K⁺ channel Kv1.3 by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and the kinase SGK1. *Pflugers Arch* 2003; 445(Suppl1). *Abstract*.
7. Schniepp R, Henke G, Boehmer C, Broer S, Lang F. Glutamate transporter EAAT2 regulation by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and the kinase SGK1. *Pflugers Arch* 2003; 445(Suppl1). *Abstract*.
8. Wagner S, Boehmer 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 protein kinase B. *Pflugers Arch* 2003; 445(Suppl1). *Abstract*.
9. Henke G, Boehmer C, Huber SM, Lang F. Oxidative stress activates heterologously expressed rCIC-2 in *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch* 2002; 443(Suppl1). *Abstract*.
10. Palmada M, Embark HM, Henke G, Feng Y, Boehmer C, Weinman EJ, Hebert S, Lang F. The serum and glucocorticoid inducible kinase SGK1 and the Na⁺/H⁺ exchanger regulating factor NHERF2 synergize to stimulate the renal outer medullary K⁺-channel ROMK1. *Pflugers Arch* 2002; 443(Suppl1). *Abstract*.

11. Setiawan I, Henke G, Feng Y, Boehmer C, Vasilets LA, Schwarz W, Lang F. Stimulation of *Xenopus* oocyte Na⁺/K⁺-ATPase by the serum and glucocorticoid dependent kinase SGK1. *Pflugers Arch* 2002; 443(Suppl1). *Abstract*.
12. Shumilina E, Durantou C, Tanneur V, Henke G, Kremsner P, Lang F, Huber SM. Cell volume- and Redox-sensitive inwardly rectifying Anion channels in *Plasmodium falciparum* – parasitized human erythrocytes. *Pflugers Arch* 2002; 443(Suppl1). *Abstract*.