

**Aus dem Institut für Physiologie der Universität Tübingen**

**Abteilung Physiologie I**

**Leiter: Professor Dr. F.Lang**

**Regulation des epithelialen Calciumkanals  
TRPV5 durch die Serum- und Glukokortikoid-  
Induzierbare Kinase SGK1 und das  
Gerüstprotein NHERF2**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard -Karls -Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Susanne Gerhilt Dorothee Poppendieck**

**aus**

**Stuttgart**

**2008**

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichtstatter:	Professor Dr. F. Lang
2. Berichtstatter:	Professor Dr. T. Risler



1	Einleitung .....	6
1.1	Aufbau und Funktionen der Niere .....	6
1.2	Calciumhaushalt des Körpers .....	7
1.3	Der epitheliale Calciumkanal TRPV5 .....	9
1.3.1	Molekularer Aufbau .....	10
1.3.2	Elektrophysiologische Charakteristika .....	11
1.3.3	Funktion und Regulation .....	12
1.4	Die Serum- und Glukokortikoid-induzierbare Kinase 1 (SGK1).....	13
1.4.1	Funktion .....	15
1.4.2	Regulation.....	16
1.5	Das „Scaffold“-Protein NHERF2 .....	17
1.5.1	Molekularer Aufbau.....	17
1.5.2	Funktion .....	18
1.6	Xenopus laevis-Oozyten als Expressionssystem.....	20
1.7	Fragestellung der Arbeit.....	22
2	Material und Methoden .....	24
2.1	Verwendete Lösungen und Substanzen .....	24
2.1.1	OR2-Lösung.....	24
2.1.2	Ca <sup>2+</sup> -freie ND96-Lösung .....	25
2.1.3	Spannungsklemme-Meßlösung 1, Ca <sup>2+</sup> -frei .....	25
2.1.4	Spannungsklemme -Meßlösung 2, mit Ca <sup>2+</sup> .....	26
2.1.5	ND96.....	27
2.1.6	1% BSA (Bovine Serum Albumin) / ND96.....	28
2.1.7	Antikörper der Lumineszenzmessung.....	28
2.1.8	Lumineszenzsubstrat .....	29
2.1.9	Bindungspuffer (“Pull-down“-Verfahren) .....	29
2.1.10	Bindungspuffer 1 (“Overlay“-Verfahren).....	29
2.1.11	Bindungspuffer 2 (“Overlay“-Verfahren).....	30
2.2	Oozytenpräparation.....	31
2.3	cRNA-Injektion .....	31
2.4	Zielgerichtete Mutagenese.....	33
2.5	cRNA-Synthese.....	36
2.6	Lumineszenz.....	37
2.7	Zwei-Elektroden-Spannungsklemme .....	38
2.8	„Pull-down“-Verfahren .....	40
2.9	„Overlay“-Verfahren .....	40
2.10	Statistik .....	41
3	Ergebnisse .....	42
3.1	Das Gerüstprotein NHERF2 benötigt die Proteinkinase <sup>S422D</sup> SGK1 um die Aktivität von TRPV5 zu stimulieren .....	42
3.2	NHERF2 interagiert mit dem C-Terminus von TRPV5 .....	44
3.3	Die 2. PDZ-Domäne auf NHERF2 wird für die Stimulation der TRPV5-Aktivität durch <sup>S422D</sup> SGK1 und NHERF2 benötigt .....	50

3.4	Die SGK1-Konsensussequenz auf TRPV5 ist für die Stimulation von TRPV5 durch <sup>S422D</sup> SGK1 und NHERF2 notwendig.....	52
3.5	Die Koexpression von <sup>S422D</sup> SGK1 und NHERF2 erhöht die Plasmamembranabundanz von TRPV5.....	54
4	Diskussion.....	57
4.1	Ergebnisdiskussion.....	57
4.1.1	Das Gerüstprotein NHERF2 benötigt die Proteinkinase <sup>S422D</sup> SGK1 zur Stimulation von TRPV5.....	57
4.1.2	NHERF2 interagiert durch seine 2. PDZ-Domäne mit dem C-Terminus von TRPV5.....	58
4.1.3	Die SGK1-Konsensussequenz auf TRPV5 ist für dessen Stimulation durch NHERF2 und <sup>S422D</sup> SGK1 notwendig.....	58
4.1.4	Die Koexpression von NHERF2 und <sup>S422D</sup> SGK1 erhöht die Plasmamembranabundanz von TRPV5.....	59
4.2	Fehlerdiskussion.....	60
4.2.1	Oozytenpräparation.....	60
4.2.2	Lösungen und Geräte.....	61
4.3	Perspektiven.....	62
4.4	Schlußfolgerung.....	66
5	Zusammenfassung.....	67
6	Literaturverzeichnis.....	68
7	Danksagung.....	81
8	Lebenslauf.....	82

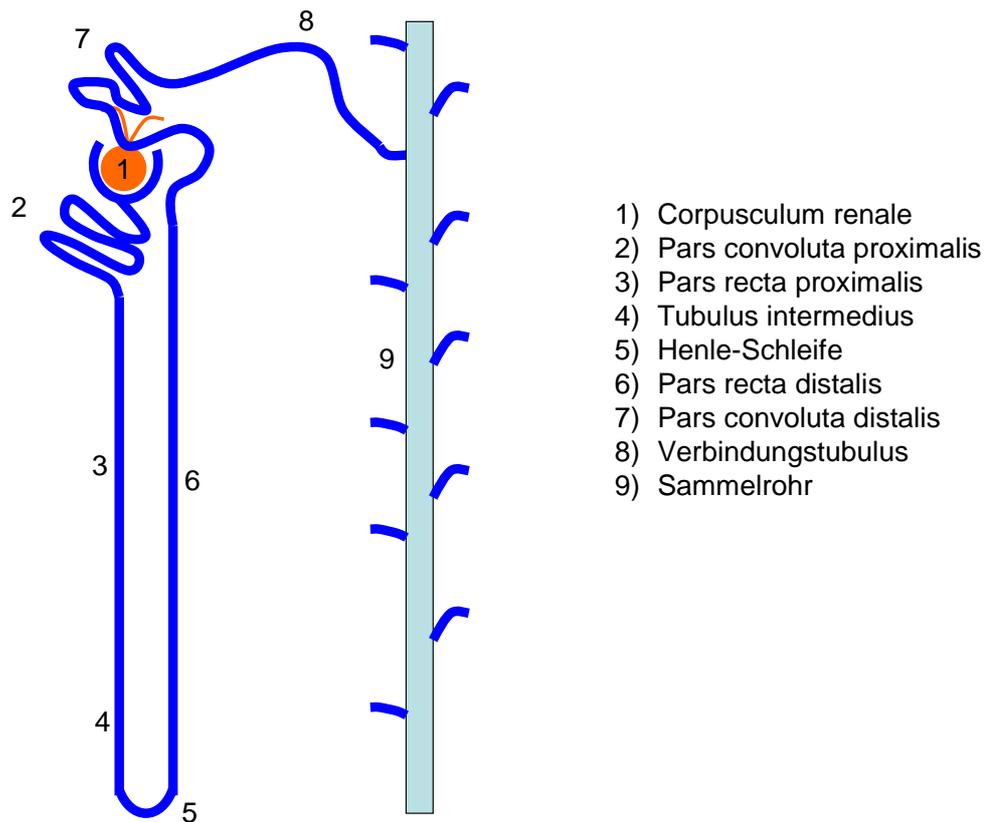
# 1 Einleitung

## 1.1 *Aufbau und Funktionen der Niere*

Die Niere stellt ein lebensnotwendiges Organ mit unterschiedlichsten Funktionen dar. Harnpflichtige Substanzen wie z.B. Harnsäure oder auch Medikamente werden über sie ausgeschieden. Sie besitzt auch endokrine Fähigkeiten und bildet Hormone wie Erythropoetin, Renin und Kalzitriol, außerdem spielt sie eine wichtige Rolle in der Regulation des Säure-Basen- und des Wasser- und Elektrolythaushaltes.

Die funktionelle Grundeinheit der Niere bildet das Nephron. Eine gesunde Niere besitzt jeweils ca. 1 Million Nephren. Ein Nephron besteht aus dem Corpusculum renale (Nierenkörperchen) und dem Tubulussystem. Letzteres läßt sich in vier Abschnitte unterteilen. Zunächst wird der Harn über den proximalen Tubulus (Pars convoluta und Pars recta) geleitet, um anschließend in den intermediären und den distalen Tubulus (Pars recta und Pars convoluta) zu gelangen. Die Pars recta des proximalen und des distalen Tubulus sowie der Intermediärtubulus bilden hierbei die Henle-Schleife. Anschließend wird der Harn mehrerer Nephrene über den jeweiligen Verbindungstubulus zum Sammelrohr geleitet und von dort aus über Ureter, Harnblase und Urethra ausgeschieden.

Pro Tag wird ca. 180 l Primärharn gebildet, welcher allerdings zum Großteil rückresorbiert wird, so daß nur ca. 1,5 l Endharn tatsächlich ausgeschieden werden.



**Abbildung 1: Aufbau eines Nephrons; modifiziert nach Schiebler, Schmidt, Zilles, Anatomie, 8. Aufl., 1999: 596-601; ein Nephron besteht aus dem Corpusculum renale und dem Tubulussystem, welches unterteilt wird in Pars convoluta proximalis, Pars recta proximalis, Tubulus intermedius, Pars recta distalis, Pars convoluta distalis und Verbindungstubulus; die Pars recta des proximalen und distalen Tubulus und der Intermediärtubulus bilden die Henle-Schleife; die Verbindungstubuli schließen die Nephrene an die Sammelrohre an**

## 1.2 Calciumhaushalt des Körpers

Calcium ist ein wichtiger Mineralstoff des menschlichen Organismus, welcher zu 99% im Knochen gebunden als Hydroxylphosphatit vorliegt. Die ionische Form,  $\text{Ca}^{2+}$ , spielt als intrazellulärer Transmitter eine entscheidende Rolle bei Prozessen wie Sekretion, Muskelkontraktion oder neurologischer Erregungsleitung (43;80;87).

Die Regulation der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erfolgt über die drei Hormone Parathormon, Kalzitriol und Kalzitinin. Parathormon (PTH) wird in der

Nebenschilddrüse gebildet und beim Sinken der plasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ausgeschüttet. Es fördert neben einer ossären Mobilisation von  $\text{Ca}^{2+}$  und  $(\text{HPO}_4)^{2-}$  die tubuläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Resorption und die renale Phosphatausscheidung. Der sinkende Phosphatspiegel führt durch Stimulation der renalen  $1\alpha$ -Hydroxylase zu einer gesteigerten Synthese von  $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -Vitamin  $\text{D}_3$  (Kalzitriol) (43;87). Kalzitriol bewirkt eine vermehrte renale und tubuläre Resorption von  $\text{Ca}^{2+}$ . Kalzitonin wird in den C-Zellen der Schilddrüse gebildet und agiert als PTH-Gegenspieler. Bei erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Blutspiegeln hemmt es die Osteoklastenaktivität und fördert dadurch den Einbau von  $\text{Ca}^{2+}$  in den Knochen. Das physiologische Zusammenspiel der drei Hormone ist ausschlaggebend für das  $\text{Ca}^{2+}$ -Gleichgewicht im Körper (43;87).

Die epitheliale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme ist über verschiedene Wege möglich. Sie erfolgt zum Großteil parazellulär über tight junctions entlang eines chemischen Gradienten im proximalen Tubulus und dem aufsteigenden Teil der Henle-Schleife. Die Resorption der restlichen 15% wird durch einen aktiven transzellulären Transport im Bereich der Pars convoluta distalis und im Sammelrohr gewährleistet (5;34;48;65;80;99;109).

Die beiden epithelialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle TRPV5 und TRPV6 bilden den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des epithelialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transports. Dabei wirkt TRPV5 besonders auf renaler und TRPV6 auf intestinaler Ebene (48;100). Der transzelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport ist ein dreistufiger Prozeß. Im distalen Nephron erfolgt zunächst der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Lumen durch die apikale Membran über TRPV5 ins Zellinnere. Im Zytosol werden die Ionen anschließend an Calbindin- $\text{D}_{28\text{K}}$  gebunden und hiernach an der basolateralen Membran über eine  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA1b) und einen  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX1) aus der Zelle ausgeschleust (48).

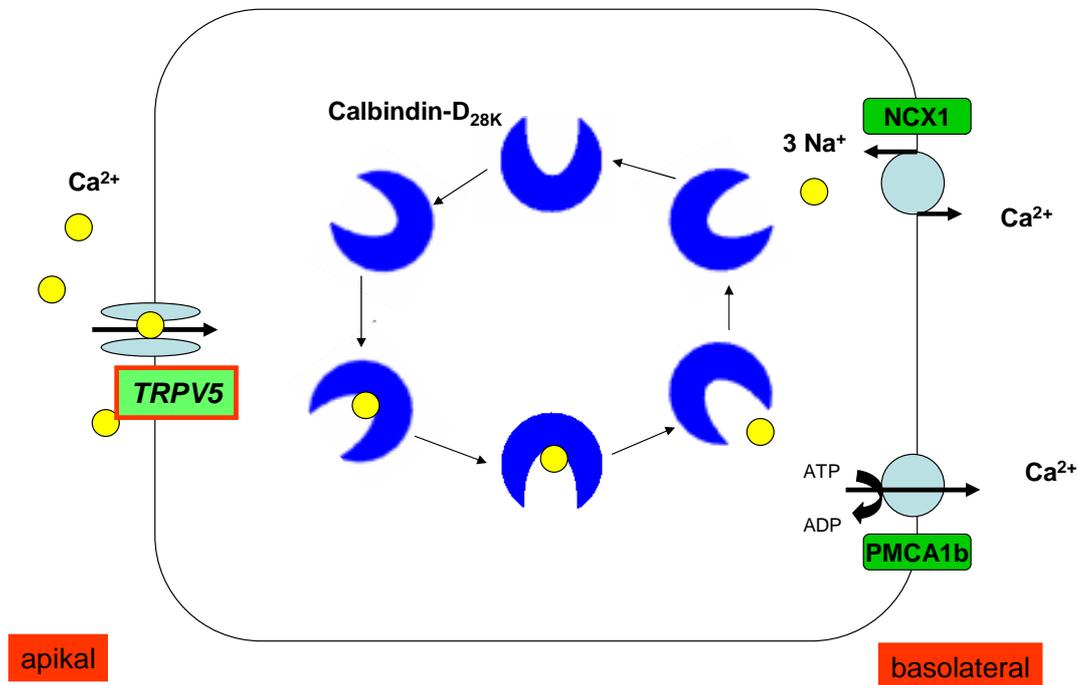


Abbildung 2: Renale transzelluläre Calciumreabsorption; modifiziert nach van de Graaf (Review 2005); der transzelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport ist ein dreistufiger Prozess;  $\text{Ca}^{2+}$  strömt aus dem Lumen durch die apikale Membran ins Zellinnere, dort wird es an Calbindin- $\text{D}_{28\text{K}}$  gebunden und anschließend an der basolateralen Membran über PMCA1b und NCX1 aus der Zelle ausgeschleust

### 1.3 Der epitheliale Calciumkanal TRPV5

Die TRPV-Kanäle bilden eine der 6 Untergruppen der TRP-Kanäle (Transient Receptor Potential cation channels) (47;67). Benannt sind sie nach ihrem ersten identifizierten Mitglied, dem Vanilloid-Rezeptor 1 (VR1) (47). Sie sind in unterschiedlichste biologische Effekte wie Schmerzwahrnehmung und männliche Aggression involviert (50). Es sind sechs Mitglieder bekannt, welche sich in zwei Gruppen aufteilen: V1/V2/V3/V4 und V5/V6 (22).

TRPV5, auch bekannt als ECaC1, gehört zusammen mit TRPV6 zu den  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitivsten ( $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} > 100$ ) TRP-Mitgliedern (101). Die Identifikation erfolgte

zunächst durch Expressionsklonierung aus einer cDNA-Genbank von Sammelrohrzellen neuseeländischer Kaninchen (49). Nachfolgend gelang die Klonierung aus anderen Spezies wie Ratte, Maus und Mensch. Die entsprechende humane DNA kodiert ein Protein bestehend aus 729 Aminosäuren und einer Molekularmasse von 83 kDa. Die chromosomale Lokalisation konnte auf dem langen Arm von Chromosom 7 in Position 7q35 bestimmt werden (48;68;69;101).

TRPV5 ist wie oben beschrieben in der apikalen Membran der Epithelien der Pars convoluta distalis und des Sammelrohres lokalisiert. Darüber hinaus findet er sich noch in Duodenum, Jejunum, Kolon, Pankreas, Plazenta, Prostata, Hoden, Gehirn und Knochen (51;72).

### **1.3.1 Molekularer Aufbau**

Entsprechend der Struktur anderer TRP-Kanäle besteht TRPV5 aus sechs Transmembran-Domänen (TMD) und einem kurzen hydrophoben Abschnitt zwischen TMD 5 und 6, welcher die  $\text{Ca}^{2+}$ -Pore formt. Die N- und C-Termini sind intrazellulär lokalisiert und es wurden mehrere Ankyrin-Wiederholungen und jeweils eine PDZ-Domäne nachgewiesen. Ankyrin-Wiederholungen und PDZ-Domänen sind wichtige Protein-Protein-Interaktionsmotive. Außerdem enthalten die N- und C-Termini von TRPV5 putative Phosphorylierungsstellen für Proteinkinase C (PKC) und die Serum- und Glukokortikoid- induzierbare Kinase (SGK1) (47;100).

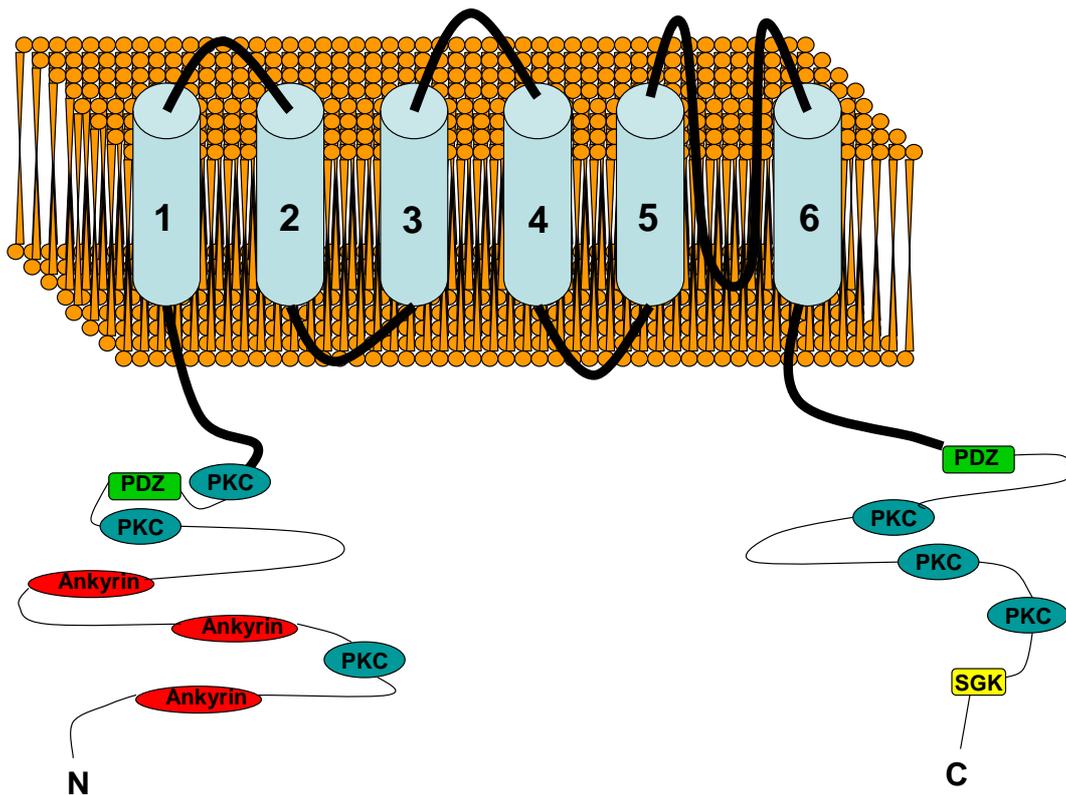


Abbildung 3: Molekularer Aufbau von TRPV5; modifiziert nach van de Graaf (Review 2006); TRPV5 besteht aus sechs Transmembran-Domänen (TMD); zwischen TMD 5 und 6 formt ein kurzer hydrophober Abschnitt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Pore; die intrazellulär lokalisierten N- und C-Termini enthalten mehrere Ankyrin-Wiederholungen, jeweils eine PDZ-Domäne und putative Phosphorylierungsstellen für PKC und SGK1

### 1.3.2 Elektrophysiologische Charakteristika

Ein besonderes Merkmal von TRPV5 ist die hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Selektivität des Kanals. Er zeigt eine ligandenunabhängige Aktivität für physiologische Membranpotentiale und Calciumkonzentrationen und weist eine einwärtsgerichtete Strom-Spannungscharakteristik auf. TRPV5 wird  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig autoreguliert. Dabei kommt es bei einer erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu einer langsamen Inaktivierung und Hemmung des Kanals. Eine Abnahme der intrazellulären Calciumkonzentration oder eine Hyperpolarisation der Zelle führt zu einer Zunahme des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms (70;74;101).

### 1.3.3 Funktion und Regulation

Wie in Kapitel 1.2 berichtet, ist TRPV5 entscheidend für den renalen transzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport und somit für die aktive Feinregulation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gleichgewichts des Körpers.

Mehrere Hormone beeinflussen TRPV5. Dazu zählen Parathormon,  $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -Vitamin  $\text{D}_3$  und Östrogen (96).

Parathormon stimuliert nicht nur die Expression von TRPV5, sondern auch die von Calbindinen und NCX1. Je höher hierbei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch TRPV5 ist, desto größer ist auch die Expression der nachfolgenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportproteine (97).

Hoenderop und Mitarbeiter zeigten 2001, daß die Gabe von  $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -Vitamin  $\text{D}_3$  an Vitamin- $\text{D}_3$ -verarmte Ratten zu einer Steigerung von TRPV5-mRNA in der Niere führte. TRPV5 verfügt des Weiteren über mehrere mutmaßliche VDREs (Vitamin D Responsive Elements) (46;69).

Östrogen führt zu einer Aufregulation der TRPV5-Expression in der Niere. Dabei handelt es sich um einen  $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -Vitamin  $\text{D}_3$ -unabhängigen Prozeß (96).

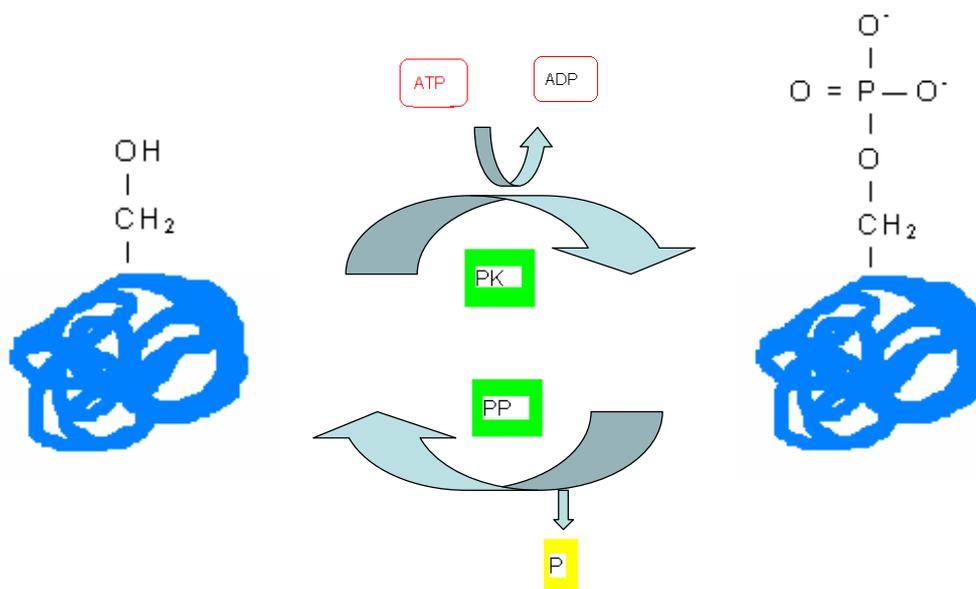
Auch Veränderungen des extrazellulären pH-Wertes und der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wirken an der Regulation von TRPV5 mit (75;102).

Hoenderop und Mitarbeiter zeigten 2003 anhand von mutierten Mäusen, die kein TRPV5 exprimieren konnten, daß diese eine starke Polyurie, Hypercalciurie und Ansäuerung des Urins aufwiesen, bedingt durch eine verminderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Resorption im Bereich der Pars convoluta distalis und des Sammelrohrs. Trotz erhöhter  $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -Vitamin- $\text{D}_3$ -Spiegel kam es zu einer verminderten Expression von Calbindin- $\text{D}_{28\text{K}}$  und NCX1. Der Serumcalciumspiegel blieb allerdings im Normbereich, da der erhöhte renale  $\text{Ca}^{2+}$ -Verlust durch eine  $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -Vitamin- $\text{D}_3$ -induzierte intestinale Hyperabsorption kompensiert wurde. Des Weiteren zeigten die mutierten Mäuse eine verminderte Knochendichte des Femurkopfes, was darauf hinweist,

daß TRPV5 eine Rolle in der Regulation der Knochenstruktur spielen könnte (50;84;97).

#### **1.4 Die Serum- und Glukokortikoid-induzierbare Kinase 1 (SGK1)**

SGK1 (serum and glucocorticoid inducible kinase) gehört zu den Serin/Threonin-Proteinkinasen. Proteinkinasen sind Enzyme, welche Signalproteine durch Anhängung einer oder mehrerer Phosphatgruppen an bestimmte Aminosäuresequenzen aktivieren können. Das Signalprotein kann hierbei wiederum als Proteinkinase fungieren und ist dabei oft in Phosphorylierungskaskaden organisiert, das heißt, daß ein Protein immer das nächste aktiviert und das Signal dadurch weitergegeben wird. Durch die Übertragung einer Phosphatgruppe von ATP auf die Hydroxylgruppe einer Aminosäureseitenkette des Zielproteins kann zum einen dessen Konformation und Aktivität verändert werden, zum anderen kann eine neue Bindungsstelle von anderen Proteinen erkannt werden. Eine entsprechende Protein-Phosphatase kann die umgekehrte Reaktion durch eine hydrolytische Entfernung der Phosphatgruppe (Dephosphorylierung) katalysieren.



**Abbildung 4 : Proteinphosphorylierung und -dephosphorylierung; modifiziert nach Alberts, Molekularbiologie der Zelle, 4.Aufl., 2004: 204; die Proteinkinase (PK) überträgt eine Phosphatgruppe (P) von ATP auf die Hydroxylgruppe einer Aminosäureseitenkette des Zielproteins; die entsprechende Protein-Phosphatase (PP) bedingt umgekehrt eine hydrolytische Entfernung der Phosphatgruppe**

Die Proteinkinasen können abhängig von der Aminosäuregruppe, die sie phosphorylieren, in zwei Gruppen unterteilt werden. Man unterscheidet die häufigeren Serin/Threonin- von den Tyrosin-Proteinkinasen (2).

SGK1 konnte 1993 erstmalig aus Rattentumorzellen isoliert werden. Es wurde als ein unmittelbares frühes Gen (immediate early gene) beschrieben, welches innerhalb von 30 Minuten transkriptionell durch Serum und Glukokortikoide aufreguliert wurde. Neben den Proteinkinasen A, G und C gehört es der Unterfamilie der AGC-Proteinkinasen an. Es kodiert ein Protein mit einer Masseneinheit von 49 kDa, dessen katalytische Domäne eine 54%ige Ähnlichkeit zu Proteinkinase B aufweist (57;111).

Die humane Form konnte 1997 aus humanen Hepatomzellen isoliert werden. Es handelt sich um ein Gen, welches bei Zellschrumpfung transkriptionell hochreguliert wird und damit eine Rolle bei der Regulation des Zellvolumens einnimmt. Das entsprechende Protein weist eine etwaige 98%ige Ähnlichkeit zum Pendant der Ratte auf (106). Das Gen, welches SGK1 kodiert, liegt auf

dem Chromosom 6q23 (107). SGK1 ist in vielen Geweben vorhanden wie Leber, Pankreas, Herz, Skelettmuskel, Lunge, Niere, Plazenta und Gehirn (106)

#### 1.4.1 Funktion

SGK1 ist in unterschiedlichste Funktionen involviert wie Zellproliferation und Apoptose, Zellvolumenregulation, Hormonausschüttung und die Regulation vieler Ionenkanäle und Transporter, z.B. ENaC (19) und ROMK1 (78).

Leong und Mitarbeiter zeigten 2002, daß die Expression von SGK1 eine Überlebensantwort einer Zelle auf verschiedene Umweltstreßfaktoren darstellt (60). SGK1 hat einen antiapoptotischen Effekt, welcher teilweise auf die Phosphorylierung von Forkhead-Transkriptionsfaktoren zurückzuführen ist (16;90). Des weiteren zeigte sich, daß SGK1 durch Hemmung der Apoptose ein Onkogen in Brustkrebszellen darstellt (118).

Untersuchungen an *Xenopus*-Oozyten zeigten, daß SGK1 die Aktivität des Zellvolumen-regulierenden Cl<sup>-</sup>-Kanals CIC2 erhöht (76). Die Beobachtung, daß zum einen eine Aktivierung dieses Kanals zu einer Verminderung des Zellvolumens führt und zum anderen eine Zellschrumpfung eine starke Aufregulierung von SGK1 bewirkt, führten zu der Vermutung, daß SGK1 regulatorisch die Zellvolumenabnahme beeinflussen könnte (56;106).

Ullrich und Mitarbeiter zeigten 2005, daß SGK1 die Aktivität des spannungsabhängigen K<sup>+</sup>-Kanals K<sub>v</sub>1.5 steigert. Eine erhöhte K<sub>v</sub>1.5-Aktivität führt in β-Zellen des Pankreas zu einer Abnahme des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms und einer verminderten Insulinausschüttung (95).

SGK1 ist an der Regulation verschiedenster Ionenkanäle und Transporter beteiligt, welche u.a. essentiell sind für den renalen Elektrolyttransport (28;77;78;115), die kardiale Funktion (11;29) und neuromuskuläre Funktionen (9;10;12;88;92).

### **1.4.2 Regulation**

SGK1 kann sowohl auf der Ebene der Transkription als auch posttranslational reguliert werden.

#### **Transkriptionale Regulation**

Die Transkription des SGK1-Gens kann durch intra- und extrazelluläre Signale verändert werden. Eine Vielzahl von Faktoren führt zu dessen Aufregulation. Dazu gehören u.a. Serum und Glukokortikoide (13;110;111), Mineralokortikoide (4;13;19), Follikel Stimulierendes Hormon (FSH) (20), Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (58;108), Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (23),  $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D<sub>3</sub> (1), Interleukin 6 (64), Thrombin (3), Endothelin (112), Fibroblast Growth Factor (FGF), Platelet Derived Growth Factor (PDGF) (66), Carbachol und Vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP) (105).

Des Weiteren kann die SGK1-Transkription gesteigert werden durch erhöhte extrazelluläre Glukose-Konzentrationen (58), ultraviolette Strahlung, oxidativen Streß, Hitzeschock (60), erhöhten intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegel (52) oder auch im Rahmen nephrologischer Erkrankungen wie der diabetischen Nephropathie und der Glomerulonephritis (35;58). Ursprünglich als Gen identifiziert, welches transkriptionell durch Zellschrumpfung aktiviert wurde, wird SGK1 in renalen Epithelzellen eher durch Zellschwellung hochreguliert (85).

Die Expression von SGK1 wird durch Heparin gehemmt (25).

#### **Posttranslationale Regulation**

Um funktionsfähig zu sein, muß das SGK1-Protein durch eine reversible Phosphorylierung (entsprechend der oberen Abbildung) aktiviert werden. Diese findet an zwei unterschiedlichen Lokalisationen statt: an <sup>256</sup>Thr und an <sup>422</sup>Ser. Die Phosphorylierung erfolgt durch Aktivierung einer PI3-Kinase (3-Phosphoinositid-Kinase)-Signalkaskade. <sup>256</sup>Thr liegt im Bereich der T-Schleife (activation loop) der katalytischen Domäne und benötigt zur Phosphorylierung PDK1 (3-Phosphoinositid (PIP3)-abhängige Kinase 1). PDK2 (PIP3-abhängige

Kinase 2) vermittelt die Phosphorylierung von <sup>422</sup>Ser, welche in einem hydrophoben Abschnitt ihres C-Terminus lokalisiert ist. Wird SGK1 zuerst an <sup>422</sup>Ser phosphoryliert, erleichtert dies deren Interaktion mit PDK1 im Bereich der PDK1-Interaktions-Fragment (PIF)-bindenden Tasche und nachfolgend die Phosphorylierung an <sup>256</sup>Thr durch PDK1. SGK1 wird über die PIP3-Signalkaskade durch Insulin und IGF-1 (Insulin like growth factor) stimuliert (7;8;53;56;57;79).

Die optimalen Konsensussequenzen für eine Phosphorylierung durch SGK1 sind R-x-R-x-x-S/T und R-R-x-S/T (79;114).

## **1.5 Das „Scaffold“-Protein NHERF2**

NHERF2 (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>- exchanger 3 regulatory factor) gehört zu den Gerüstproteinen (scaffold proteins). Diese dienen dazu, Gruppen miteinander korrespondierender Signalproteine zu einem Signalkomplex zu organisieren. Dadurch wird die Signalübertragung erleichtert.

NHERF2 wurde mittels einer Hefe-cDNA-Genbank kloniert und kodiert ein Protein bestehend aus 451 Aminosäuren (117). Ursprünglich wurde NHERF2 neben NHERF1 als Protein identifiziert, welches die Regulation von NHE3 vermittelt. NHE3 ist der apikale epitheliale Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher, der sich im proximalen Tubulus, dem aufsteigenden Teil der Henle-Schleife und im Darm befindet (62;89). NHERF2 findet sich allerdings in einer Vielzahl von humanen Geweben wie Dünndarm, Dickdarm, Ovar, Prostata, Milz, Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskulatur, Niere, Pankreas und Thymus (117).

### **1.5.1 Molekularer Aufbau**

NHERF2 zeigt eine Ähnlichkeit von ca. 50% mit NHERF1 und kodiert ein Protein, welches zwei PDZ-Domänen (PSD-95/Dlg/ZO-1) enthält (117). Dies

sind Domänen, die ursprünglich in einer Synapsenregion gefunden wurden, die „postsynaptische Dichte“ genannt wurde. Sie vermitteln die Interaktion zwischen Proteinen und erleichtern dadurch viele zellbiologische Prozesse. Davon betroffen sind z.B. die Kopplung von Ionenkanälen an das Zytoskelett, die Phosphorylierung und auch die Zielsteuerung (Targeting) von Ionenkanälen (2;31;48). PDZ-Domänen sind relativ klein (90-100 Aminosäuren) und bestehen aus sechs  $\beta$ -Strängen und zwei  $\alpha$ -Helices. Bei ihren Liganden erkennen sie spezifische kurze Peptidmotive im C-Terminus, an die sie binden können (-X-S/T-X-V/I/L/M) (42). SGK1 besitzt ein putatives PDZ-Bindungsmotiv (D-S-F-L) auf seinem C-Terminus (21).

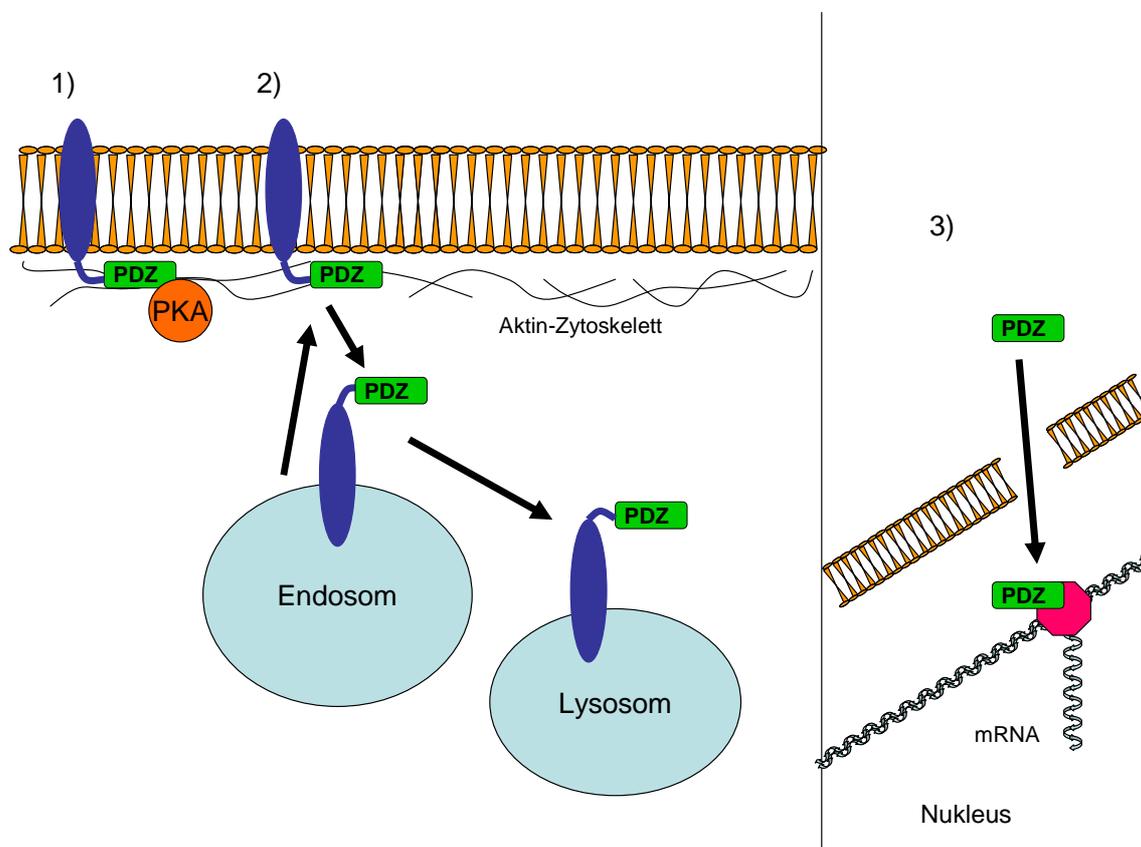
Des Weiteren besitzt NHERF2 eine ERM-bindende Domäne im C-Terminus (116). Die ERM (ezrin-radixin-moesin)-Familie besteht aus zytoskelettassoziierten Proteinen, die als Signalübermittler zwischen der Plasmamembran und dem Zytoskelett dienen (71).

### **1.5.2 Funktion**

NHERF2 kommt in einer Vielzahl von humanen Geweben vor. In der Niere konnte NHERF2 u.a. in den Prinzipalzellen des Sammelrohrs nachgewiesen werden (104). Die daraus resultierende Annahme, daß es auch an der Regulation anderer Proteine beteiligt sein könnte, bestätigte sich. NHERF2 ist überwiegend an der Zelloberfläche lokalisiert. Dementsprechend handelt es sich bei den potentiellen Zielen insbesondere um Membranproteine, Ionenporter und Rezeptoren (91). Als betroffene Proteine konnten u.a. CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) und PTH1R (parathyroid hormone 1 receptor) identifiziert werden (40;63).

NHERF2 kann über seine Verknüpfung mit Aktin-ERM-Proteinen eine Verbindung zwischen Ionenportern und Signalumwandlern, wie z.B. Proteinkinase A (PKA), herstellen und auf diese Weise die hormonelle Regulation des Transporters (z.B. NHE3) vereinfachen. Des Weiteren kann NHERF2 Membranproteine aus ihrem intrazellulären endosomalen Pool an die

Zellmembran lenken oder Oberflächenproteine zu Lysosomen leiten, wo diese abgebaut und inaktiviert werden. NHERF2 spielt dadurch eine wichtige Rolle in der Oberflächenexpression vieler Membranproteine, wie z.B.  $\beta_2$ -AR (beta2-adrenerger Rezeptor) (18;41). Darüber hinaus wird vermutet, daß NHERF-Proteine zwischen Nukleus und Zytoplasma pendeln und auf diese Weise durch Vereinigung mit DNA-bindenden Proteinen oder Transkriptionsfaktoren die genetische Aktivität von Transportern und anderen regulatorischen Proteinen fördern können (91).



**Abbildung 5: Funktion von NHERF2; modifiziert nach Shenolikar et al., Physiology 19: 362-369, 2004; 1) NHERF2 stellt über seine Verbindung mit dem Aktin-Zytoskelett eine Verknüpfung zwischen Ionentransportern und Signalumwandlern (z.B. PKA) her; 2) NHERF2 bringt als „trafficking“-Protein Membranproteine aus ihren endosomalen Pools an die Oberfläche oder von der Oberfläche zum Abbau in Lysosomen; 3) NHERF-Proteine pendeln zwischen Nukleus und Zytoplasma und vereinigen sich mit DNA-bindenden Proteinen oder Transkriptionsfaktoren**

## 1.6 *Xenopus laevis*-Oozyten als Expressionssystem

*Xenopus laevis* (Südafrikanischer Krallenfrosch) gehört der Gattung *Xenopus* an, welche eine Unterfamilie der Zungenlosen Frösche (Pipidae) bildet (103). Er stellt neben u.a. der Maus, dem Huhn und der Drosophila-Fliege ein wichtiges Labortier dar, welches in der Forschung auf dem Gebiet der Zell- und Molekularbiologie verwendet wird. In den 40er und 50er Jahren des letzten Jahrhunderts wurden weibliche *Xenopus laevis*-Frösche zunächst als Versuchstiere im Rahmen von Schwangerschaftstests verwendet. Hobgen zeigte 1930, daß hypophysektomierte weibliche *Xenopus*-Frösche eine Rückbildung der Ovarien erleiden, wohingegen sowohl die Einpflanzung der Drüsen als auch die Injektion von Hypophysenvorderlappenextrakt von Ochsen eine Ovulation hervorrufen. Dies bildete die Grundlage des später entwickelten Hobgen-Tests. Hierbei wurde der Urin einer potentiell schwangeren Frau in den dorsalen Lymphsack eines *Xenopus*-Weibchens injiziert. Das im Urin Schwangerer enthaltene humane Choriongonadotropin (HCG) bedingt, daß das Tier innerhalb von 8-12 Stunden Eier produziert (38;103).



Abbildung 6 : *Xenopus laevis* und Oozyten

1971 zeigten Gurdon und Mitarbeiter, daß *Xenopus laevis*-Oozyten nach Injektion der entsprechenden mRNA Hämoglobin bilden konnten (39). Seitdem stellen die Oozyten ein beliebtes Expressionssystem dar.

Die Tatsache, daß durch Injektion bestimmter Hormone weibliche *Xenopus laevis*-Frösche das ganze Jahr über zur Bildung von Oozyten angeregt werden können, ist nur einer der Vorteile dieses Labortiers. Darüber hinaus ist die Haltung der Tiere einfach und billig, sie sind sehr widerstandsfähig und kurzlebig. Aufgrund ihres großen Durchmessers von 1,1 – 1,3 mm ist auch die technische Handhabung der Oozyten erleichtert (37;38).

Eine Oozyte besteht aus einer helleren (vegetativer Pol) und einer dunkleren Hemisphäre (animaler Pol). Es werden sechs verschiedene Oogenese-Stadien unterschieden, welche zur gleichen Zeit nebeneinander in den Ovarien eines erwachsenen *Xenopus*-Weibchens auftreten (27). Da sich die Oozyten verschiedener Stadien nicht nur in ihrer Größe, sondern auch in ihren Stoffwechseleigenschaften unterscheiden, sollten nur Eizellen des gleichen Stadiums verwendet werden.

## 1.7 Fragestellung der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es, weitere Erkenntnisse über die Regulation des für den Calciumhaushalt wichtigen epithelialen Calciumkanals TRPV5 zu erhalten.

- 1) Wird TRPV5 durch die Proteinkinase <sup>S422D</sup>SGK1 und das Gerüstprotein NHERF2 moduliert?

In den Prinzipalzellen des Sammelrohrs konnten TRPV5, SGK1 und NHERF2 nachgewiesen werden. TRPV5 besitzt eine putative Phosphorylierungsstelle für SGK1 und an jedem Terminus ein PDZ-Bindungsmotiv, welches mit einer PDZ-Domäne von NHERF2 interagieren könnte.

- 2) Benötigt NHERF2 die Proteinkinase <sup>S422D</sup>SGK1 zur Modulation des epithelialen Calciumkanals TRPV5?

Untersuchungen an dem K<sup>+</sup>-Kanal ROMK1 zeigten, daß dieser nur durch eine Koexpression von <sup>S422D</sup>SGK1 und NHERF2 aktiviert wurde. Ziel ist es, zu untersuchen, ob dieser Mechanismus auch die Regulation von TRPV5 bewirkt.

- 3) Erfolgt die Modulation der TRPV5-Aktivität durch <sup>S422D</sup>SGK1 und NHERF2 durch eine erhöhte Plasmamembranabundanz des Kanals oder durch veränderte Eigenschaften des Kanals?

NHERF2 kann makromolekulare Komplexe bilden und interagierende Proteine zur Plasmamembran bringen und sie dort verankern. Allerdings könnte TRPV5 auch durch veränderte Kanaleigenschaften, wie z.B. eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit reguliert werden.

Des Weiteren sollte die Interaktion zwischen NHERF2 und TRPV5 weiter aufgeklärt werden.

- 1) Welcher Terminus von TRPV5 ist an der Interaktion beteiligt?
- 2) Welche PDZ-Domäne von NHERF2 ist für die Modulation notwendig?

3) Erfolgt die Modulation der TRPV5-Aktivität durch <sup>S422D</sup>SGK1 und NHERF2 durch direkte Phosphorylierung von TRPV5?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 *Verwendete Lösungen und Substanzen*

#### 2.1.1 OR2-Lösung

Die OR2-Lösung wurde zum Kollagenasenverdau der Oozyten eingesetzt, wobei ihre Kalziumfreiheit die Kollagenasenwirkung verbesserte.

Tabelle 1: Zusammensetzung der OR2-Lösung

Substanz	Konzentration
NaCl	82,5 mM
KCl	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
Tris-Hepes (pH 7,4)	5 mM

### 2.1.2 Ca<sup>2+</sup>-freie ND96-Lösung

Die Ca<sup>2+</sup>-freie ND96-Lösung wurde als Aufbewahrungsmedium der Oozyten eingesetzt. Gentamicin ist ein Antibiotikum, welches zugesetzt wurde, um Infektionen der Zellen zu verhindern.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Ca<sup>2+</sup>-freien ND96-Lösung

Substanz	Konzentration
NaCl	88 mM
KCl	1 mM
NaHCO <sub>3</sub>	2,4 mM
Tris-Hepes (pH 7,5)	5 mM
MgSO <sub>4</sub>	0,8 mM
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,3 mM
CaCl <sub>2</sub>	0,4 mM
Gentamicin	25 µg/ml

### 2.1.3 Spannungsklemme-Meßlösung 1, Ca<sup>2+</sup>-frei

Die einzelne Oozyte wurde beim Voltage-clamp-Meßvorgang zunächst in eine Ca<sup>2+</sup>-freie Meßlösung plaziert.

**Tabelle 3: Zusammensetzung der Ca<sup>2+</sup>-freien Spannungsklemme -Meßlösung**

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>
<b>NaCl</b>	<b>96 mM</b>
<b>KCl</b>	<b>2 mM</b>
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	<b>1 mM</b>
<b>Tris-Hepes (pH 7,5)</b>	<b>5 mM</b>
<b>Methoxyverapamil</b>	<b>10 µM</b>
<b>BaCl<sub>2</sub></b>	<b>1 mM</b>

#### **2.1.4 Spannungsklemme -Meßlösung 2, mit Ca<sup>2+</sup>**

Anschließend wurde die Badlösung beim Spannungsklemme-Meßvorgang durch eine Ca<sup>2+</sup>-haltige Meßlösung ausgetauscht.

**Tabelle 4: Zusammensetzung der Ca<sup>2+</sup>-haltigen Spannungsklemme-Meßlösung**

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>
<b>NaCl</b>	<b>96 mM</b>
<b>KCl</b>	<b>2 mM</b>
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	<b>1 mM</b>
<b>Tris-Hepes (pH 7,5)</b>	<b>5 mM</b>
<b>Methoxyverapamil</b>	<b>10 µM</b>
<b>BaCl<sub>2</sub></b>	<b>1 mM</b>
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	<b>10 mM</b>

### **2.1.5 ND96**

ND96 stellte die Grundlösung für die meisten verwendeten Lösungen dar und wurde für die Versuche variiert.

**Tabelle 5: Zusammensetzung von ND96**

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>
<b>NaCl</b>	<b>96 mM</b>
<b>KCl</b>	<b>2 mM</b>
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	<b>1,8 mM</b>
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	<b>1 mM</b>
<b>Tris-Hepes (pH 7,4)</b>	<b>5 mM</b>

#### **2.1.6 1% BSA (Bovine Serum Albumin) / ND96**

1% BSA/ND96 wurde als Blockierungs- und Waschlösung im Rahmen der Lumineszenzmessung verwendet.

#### **2.1.7 Antikörper der Lumineszenzmessung**

Für die Lumineszenzmessung wurden zwei verschiedene Antikörper verwendet.

- Primärer Antikörper (anti-HA-Antikörper): 1 µg/ml rat monoclonal anti-HA antibody (clone 3F10, Boehringer, Deutschland)
- Sekundärer Antikörper (anti-rat-POD): 2 µg/ml peroxidase-conjugated affinity-purified F(ab')<sub>2</sub> goat anti-rat IgG (Jackson Immuno Research, West Grove, USA)

### 2.1.8 Lumineszenzsubstrat

Das Lumineszenzsubstrat wurde am Ende des Lumineszenzmeßvorgangs zu den Oozyten hinzugegeben.

Super Signal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce, Rockford, USA)

### 2.1.9 Bindungspuffer („Pull-down“-Verfahren)

Zugefügt wurden dem Bindungspuffer entweder 1 mM CaCl<sub>2</sub> oder 2 mM EDTA.

Tabelle 6: Zusammensetzung des „Pull-down“-Bindungspuffers

Substanz	Konzentration
Tris-HCl (pH 7,4)	20 mM
NaCl	140 mM
Triton-X-100	0,2 %
NP-40	0,2 %

### 2.1.10 Bindungspuffer 1 („Overlay“-Verfahren)

Für das Overlay-Verfahren wurden zwei verschiedene Bindungspuffer verwendet.

**Tabelle 7: Zusammensetzung des „Overlay“-Bindungspuffers 1**

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>
<b>Tris-HCl (pH 7,4)</b>	<b>20 mM</b>
<b>NaCl</b>	<b>140 mM</b>
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	<b>1 mM</b>
<b>Triton-X-100</b>	<b>0,2%</b>
<b>BSA</b>	<b>3%</b>

### **2.1.11 Bindungspuffer 2 (“Overlay”-Verfahren)**

Der Bindungspuffer 2 unterscheidet sich durch seinen BSA-Gehalt vom Bindungspuffer 1.

**Tabelle 8: Zusammensetzung des „Overlay“-Bindungspuffers 2**

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>
<b>Tris-HCl (pH 7,4)</b>	<b>20 mM</b>
<b>NaCl</b>	<b>140 mM</b>
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	<b>1 mM</b>
<b>Triton-X-100</b>	<b>0,2%</b>
<b>BSA</b>	<b>0,3%</b>

## **2.2 Oozytenpräparation**

Die Oozytengewinnung erfolgte aus weiblichen, adulten Fröschen der Art *Xenopus laevis*. Zunächst wurde ein Frosch ca. 20 Minuten in 0,1%iger 3-Aminobenzoessäureethylester-Lösung (Sigma, St.Louis, Mo, USA) betäubt und auf dem Rücken liegend auf Eis plaziert. Nach gründlicher Hautdesinfektion wurde unter semisterilen Bedingungen eine ca. 1 cm lange abdominale Inzision durchgeführt und die bindegewebehaltigen Ovarialsäcke entnommen. Anschließend wurde die Inzisionsstelle mit resorbierbarem Faden verschlossen und der Frosch zum Aufwachen in einen mit etwas Wasser gefüllten Käfig gelegt.

Die Ovarialsäcke wurden mit einer Pinzette in kleine Einheiten aufgetrennt und anschließend für ca. 1-3 Stunden bei Raumtemperatur mit Kollagenase A (1-3 mg/ml) in OR2-Lösung unter fortlaufender Schleuderbewegung verdaut. Der Kollagenasenverdau wurde unter der Stereolupe kontrolliert und durch mehrmaliges Spülen mit ND96 beendet, als bei einem Großteil der Oozyten die Follikelschicht abgebaut und keine Blutgefäße mehr zu sehen waren. Nach Selektion der intakten und reifen Oozyten (Stadium V und VI nach Dumont) (27) wurden sie bis zur cRNA-Injektion in der Aufbewahrungslösung bei 16-18°C im Kühlschrank gelagert.

## **2.3 cRNA-Injektion**

Zur cRNA-Injektion wurden Borosilikatglaskapillaren (Fa.Hilgenberg, Deutschland) verwendet, die mit Hilfe eines DMZ-Universal-Pullers (Fa. Zeitz, Deutschland) hergestellt wurden. Die Kapillaren hatten einen Außendurchmesser von 1,2 mm und besaßen eine lange Spitze, welche unter mikroskopischer Kontrolle gekürzt wurde. Anschließend wurden sie mit

Paraffinöl gefüllt, um Luftfreiheit zu erzielen. Die cRNA konnte nun mit Hilfe eines Mikroinjektors aufgesaugt werden.

Beim ersten Teil der Experimente wurden die Oozyten mit jeweils 25 nl der in Tabelle 9 aufgelisteten cRNA injiziert.

**Tabelle 9: Konzentrationen und Mengen der injizierten cRNA, Teil 1**

<b>cRNA</b>	<b>Injizierte Menge der cRNA (in ng) pro Oocyte</b>	<b>Konzentration der injizierten cRNA (in ng/nl)</b>
<b>TRPV5-HA</b>	<b>2,5</b>	<b>0,1</b>
<b>SGK1</b>	<b>7,5</b>	<b>0,3</b>
<b>NHERF2</b>	<b>5</b>	<b>0,2</b>
<b>NHERF2ΔP1</b>	<b>5</b>	<b>0,2</b>
<b>NHERF2ΔP2</b>	<b>5</b>	<b>0,2</b>

Für den zweiten Teil wurden die Oozyten mit jeweils 50 nl TRPV5 oder <sup>T709A</sup>TRPV5 und 25 nl SGK1 und NHERF2 cRNA injiziert. Die entsprechenden Konzentrationen sind in Tabelle 10 aufgelistet.

**Tabelle 10: Konzentrationen und Mengen der injizierten cRNA, Teil 2**

<b>cRNA</b>	<b>Injizierte Menge der cRNA (in ng) pro Oocyte</b>	<b>Konzentration der injizierten cRNA (in ng/nl)</b>
<b>TRPV5</b>	<b>10</b>	<b>0,2</b>
<b><sup>T709A</sup>TRPV5</b>	<b>10</b>	<b>0,2</b>
<b>SGK1</b>	<b>7,5</b>	<b>0,3</b>
<b>NHERF2</b>	<b>5</b>	<b>0,2</b>

Die Oozyten wurden dazu in einer mit Ca<sup>2+</sup>-freier ND96-Lösung gefüllten Petrischale plziert, in welche ein Gitternetz eingebaut war, welches die Oozytenlokalisierung stabilisierte. Es erfolgte immer zuerst die Injektion mit SGK1 und NHERF2 bzw. NHERF2ΔP1 oder NHERF2ΔP2 und dann nach einer mindestens zweistündigen Pause die Injektion mit TRPV5 bzw. TRPV5-HA oder <sup>T709A</sup>TRPV5. Zur Vermeidung von Volumenunterschieden wurde die differierende Volumenmenge durch Injektion mit DEPC(Diethylpyrocarbonat)-Wasser ausgeglichen. Nach Injektion wurden die Oozyten in Ca<sup>2+</sup>-freier ND96-Lösung bei 16-18°C im Kühlschrank aufbewahrt.

3 Tage nach Injektion wurden die Experimente durchgeführt.

## **2.4 Zielgerichtete Mutagenese**

Mit Hilfe des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene GmbH, Heidelberg) wurde eine Mutagenese zur Herstellung von <sup>T709A</sup>TRPV5 durchgeführt. Diese Methode basiert auf der Einführung von Punktmutationen in ein Plasmid durch PCR. Dabei wurde Threonin 709 auf TRPV5 durch Alanin ausgetauscht.

```

1      MGACPPKAKG PWAQLQKLLI SWPVGEQDWE QYRDRVNMLQ QERIRDSPLL
51     QAAKENDLRL LKILLLNQSC DFQQRGAVGE TALHVAALYD NLEAATLLME
101    AAPELAKEPA LCEPFVQATA LHIAVMNQNL NLVRALLARG ASVSARATGA
151    AFRRSPHNLI YYGEHPLSFA ACVGSEEIVR LLIEHGADIR AQDSLGNLTVL
201    HILILQPNTK FACQMYNLLL SYDEHSDHLQ SLELVPNHQG LTPFKLAGVE
251    GNTVMFQHLM QKRKHVQWTC GPLTSTLYDL TEIDSWGEEL SFLELVVSSK
301    KREARQILEQ TPVKELVSEK WKKYGRPYFC VLASLYILYM ICFTTCCIYR
351    PLKLRDDNRT DPRDITILQQ KLLQEAYVTH QDNIRLVGEL VTVTGAIVIL
401    LLEIPDIFRV GASRYFGQTI LGGPFHVIII TYASLVLLTM VMRLTNMNGE
451    VVPLSFALVL GWCSVMYFAR GFQMLGPFTI MIQKMIFGDL MRF CWLMAVV
501    ILGFASAFHI TFQTEDPNNL GEFSDYPTAL FSTFELFLTI IDGPANYSVD
551    LPFMYCITYA AFAIATLLM LNLFIAMMGD THWRVAQERD ELWRAQVVAT
601    TVMLERKMPR FLWPRSGICG YEYGLGDRWF LRVENHHDQN PLRVLRYVEA
651    FKCSDKEDGQ EQLSEKRPST VESGMLSRAS VAFQTPSLSR TTSQSSNSHR
701    GWEILRRNTL GHLNLGLDLG EGDGEEVYHF

```

**Abbildung 7: TRPV5 Sequenz; die an Stelle 709 lokalisierte Aminosäure Threonin (rot) wurde durch Alanin ersetzt**

Zunächst wurden zwei Oligonukleotid-Primer hergestellt, welche die gewünschte Mutation enthielten und komplementär zueinander und zur Zielstelle der Mutagenese im Plasmid waren. Während der Temperaturzyklen kam es zur Denaturierung und Abkühlung der Plasmid-DNA und zur Verlängerung der Primer durch die PfuTurbo-DNA-Polymerase. Die hierbei neugebildeten Stränge enthielten somit die Mutation. Nach mehreren Zyklen lagen hauptsächlich Plasmide vor, bei denen beide Stränge mutiert waren.

**Tabelle 11: Die Sequenzen der benutzten Primer zur Herstellung von <sup>T709A</sup>TRPV5**

<b>sense</b>	<b>antisense</b>
<b>5' GAGATCCTTCGTCGAAACG</b>	<b>5' GATTCAAGTGTCCCAAGGC</b>
<b>CCTTGGGACACTTGAATC 3'</b>	<b>GTTTCGACGAAGGATCTC 3'</b>

Zur Entfernung der nicht-mutierten Plasmide wurde ein Verdau des Produkts mit Dpn I-Endonuklease durchgeführt. Dieses Enzym schneidet spezifisch methylierte oder halbmethylierte DNA und demzufolge nur DNA, welche in Bakterien generiert wurde.

Im Anschluß erfolgte eine Transformation der neusynthetisierten DNA in *E. coli* (XL1-Blue superkompetente Zellen), der Ausstrich auf LB-Agarplatten und DNA Isolierung aus den gewachsenen Bakterien.

Zur Überprüfung der erwünschten Mutation wurden alle Konstrukte sequenziert.

Mit Hilfe des „Two-stage PCR Protocol Allowing Introduction of Multiple Mutations, Deletions and Insertions Using QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis“ (Wang and Malcolm, *bioTechniques* 26:680-682 (1999)) wurde eine Mutagenese zur Herstellung von TRPV5-HA durchgeführt. Es wurde ein HA-Epitop in TRPV5 eingebaut, welches sich zwischen den Aminosäuren 376 und 377 befindet.

Zunächst durchliefen die zwei benutzten Primer einzeln jeweils vier PCR-Zyklen. Anschließend wurden je 25 µl der so entstandenen Reaktionslösungen kombiniert und erneut eine PCR durchgeführt. Die nachfolgende Entfernung der nicht-mutierten Plasmide und die Transformation der neusynthetisierten DNA in *E. coli* erfolgte wie oben erklärt.

**Tabelle 12: Die Sequenzen der benutzten Primer zur Herstellung von TRPV5-HA**

<b>sense</b>	<b>antisense</b>
<b>5' TACCCATACGACGTACCAGATT ACGCT '3</b>	<b>5' AGCGTAATCTGGTACGTCGTAT GGGTA '3</b>

## **2.5 cRNA-Synthese**

Die cRNA-Synthese wurde mittels des mMESSAGEmMACHINE-Kits (Ambion, Austin, USA) durchgeführt. Dabei erfolgte zunächst eine Linearisierung der cDNA und eine anschließende Transkription durch die T7-Polymerase.

**Tabelle 13: Verwendete Restriktionsenzyme zur Herstellung der cRNA**

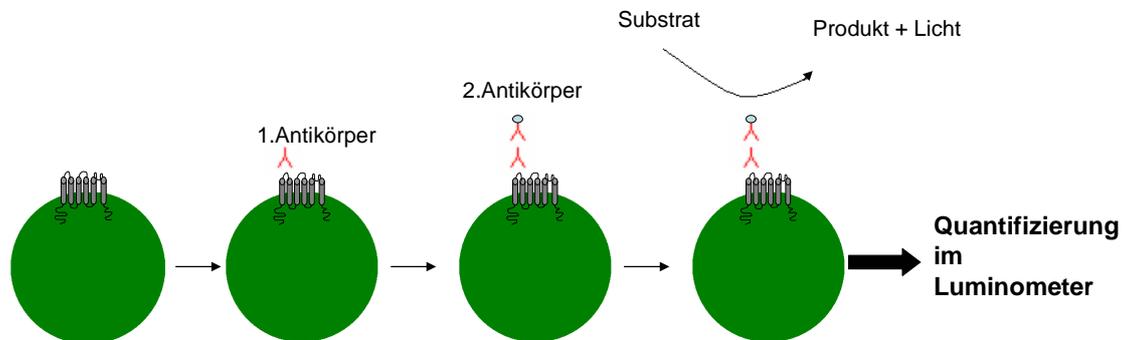
<b>cRNA</b>	<b>Restriktionsenzym zur Linearisierung</b>
<b>TRPV5</b>	<b>Not I</b>
<b>TRPV5-HA</b>	<b>Not I</b>
<b>NHERF2</b>	<b>Sal I</b>
<b>NHERF2<math>\Delta</math>P1</b>	<b>Xho I</b>
<b>NHERF2<math>\Delta</math>P2</b>	<b>Sal I</b>
<b>S422D<sub>SGK1</sub></b>	<b>Stu I</b>

Die verwendeten cDNA-Klone von NHERF2 $\Delta$ P1 und NHERF2 $\Delta$ P2 wurden freundlicherweise von Chris Yun, Atlanta, USA zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um Mutanten von NHERF2, bei denen entweder die erste (NHERF2 $\Delta$ P1) oder die zweite (NHERF2 $\Delta$ P2) PDZ-Domäne entfernt wurde.

## **2.6 Lumineszenz**

Hierzu wurden Oozyten verwendet, die zunächst mit 7,5 ng SGK1 und 5 ng NHERF2, NHERF2 $\Delta$ P1 oder NHERF2 $\Delta$ P2 cRNA oder H<sub>2</sub>O und am nächsten Tag mit 2,5 ng TRPV5-HA cRNA injiziert wurden. TRPV5-HA cRNA besitzt extrazellulär ein HA-Epitop, welches sich zwischen den Aminosäuren 376 und 377 befindet.

Die Oozyten wurden zunächst für 30 Minuten bei 4°C in 1% BSA/ND96 blockiert. Anschließend wurden sie für 1 Stunde bei 4°C mit 1 µg/ml des primären Antikörpers (anti-HA-Antikörper) inkubiert. Danach wurde der nicht-gebundene Antikörper durch 5-fache Spülungen über 30 Minuten mit 1% BSA/ND96 ausgewaschen. Im Anschluß erfolgte die Inkubation mit 2 µg/ml des sekundären Antikörpers (anti-rat-POD), der an den ersten bindet. Nach 1 Stunde wurde der nicht-gebundene Antikörper durch 10-malige Spülung mit 1% BSA/ND96 und 5-malige Spülung mit ND96 ausgewaschen. Jede einzelne Oozyte wurde nun in je 20 µl Lumineszenzsubstrat plaziert und das jeweilige Chemilumineszenzsignal wurde in einem Luminometer über eine Periode von 1 Sekunde gemessen. Die Ergebnisse wurden in RLU (relative light units) angegeben.

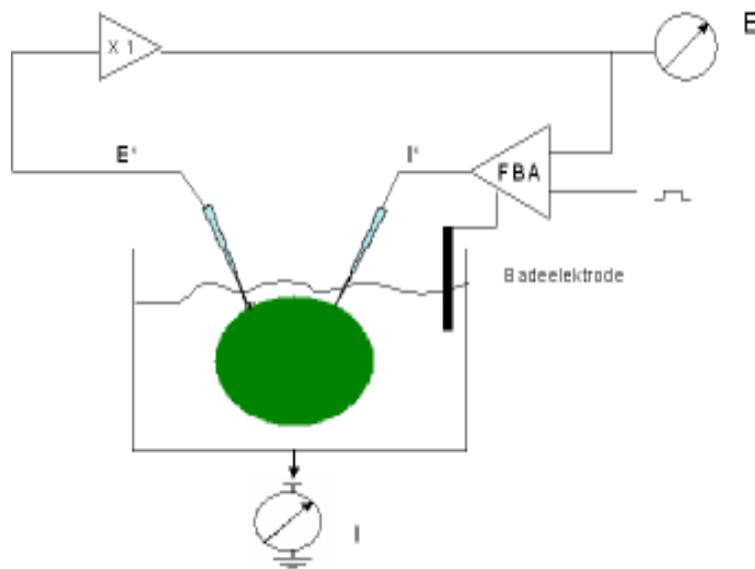


**Abbildung 8: Lumineszenzmessung:** der 1. Antikörper bindet an das extrazelluläre HA-Epitop der TRPV5-HA-Oozyten; der 2. Antikörper bindet an den ersten; nach Zugabe von Lumineszenzsubstrat entsteht ein Chemilumineszenzsignal, welches im Luminometer quantifiziert wird

## 2.7 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Das Grundprinzip dieser elektrophysiologischen Meßmethode besteht darin, daß das Membranpotential einer Oozyte auf ein beliebiges Potential geklemmt wird und der zur Beibehaltung dieses Potentials notwendige Strom gemessen wird. Dabei wurden zwei Glasmikroelektroden verwendet (GC150TF, Clark, Pangborne, UK), welche mit 3 M KCl gefüllt waren. Eine Elektrode diente hierbei zur Messung des aktuellen Membranpotentials der Oozyte, welches nach Verstärkung über einen Rückkopplungsverstärker (GeneClamp Amplifier, Axon Instruments, Union City, USA) mit dem gewünschten Haltepotential

verglichen wurde. Bei einer Abweichung wurde über die zweite Elektrode Strom in die Zelle appliziert, bis die Spannungsdifferenz ausgeglichen war. Der über die zweite Elektrode gemessene Strom ( $I$ ) entspricht dem Stromfluß über die Oozytenmembran bei einem vorgegebenen Haltepotential ( $U$ ) durch den Widerstand ( $R$ ). Hierbei gilt das Ohmsche Gesetz:  $U=R \cdot I$ .



**Abbildung 9: Spannungsklemme-Versuchsaufbau. Die Elektrode E' mißt das Membranpotential E; über die Elektrode I' wird Strom appliziert; I ist der gemessene Strom; FBA ist der Rückkopplungsverstärker**

Die Messungen wurden mit den unter 2.1.3 und 2.1.4 aufgeführten Lösungen durchgeführt. Hierbei betrug die Durchflußgeschwindigkeit 20 ml/min, wobei ein kompletter Austausch der Badlösung nach 10 s erreicht wurde. Die Zugabe von 10 mM  $\text{CaCl}_2$  induzierte einen Einwärtsstrom ( $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ ), welcher durch den Eintritt von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und die dadurch bedingte Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{Cl}^-$ -Kanälen erzeugt wurde. Als Maß für die TRPV5-Aktivität wurde der Höchstwert

des Einwärtsstroms benutzt. Durch 10  $\mu\text{M}$  Methoxyverapamil wurden weitere spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle gehemmt.

## **2.8 „Pull-down“-Verfahren**

Es handelt sich hierbei um ein Verfahren, durch welches die biochemische Interaktion zwischen zwei Proteinen *in vitro* untersucht werden kann.

Dies geschieht mit Hilfe von rekombinant hergestellten GST (Glutathion-S-Transferase)-Fusionsproteinen. Zu deren Herstellung wurden die aus einer Maus-cDNA amplifizierte TRPV5 N- und C-Termini mit EcoR I-Xho I oder BamH I-Sal I verdaut und in den Vektor pGEX6p-2 kloniert (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden). Anschließend erfolgte die Transformation in *E. coli* BL21. Mittels des GST-Gene-Fusion-Systems (Amersham Pharmacia Biotech AB) gelang die Expression und Reinigung der GST-Fusionsproteine.

4  $\mu\text{g}$  GST-Fusionsproteine wurden auf Glutathion-Sepharose 4B-Perlen immobilisiert und mit 5  $\mu\text{l}$   $^{35}\text{S}$ -Methionin markierten Interaktionsproteinen für zwei Stunden bei Raumtemperatur in Bindungspuffer inkubiert. Die Interaktionsproteine wurden mittels eines Retikulozytenlysat-Systems in Anwesenheit von  $^{35}\text{S}$ -Methionin aus NHERF2 und TRPV5 cRNA gemäß Herstellerangaben (Promega Madison, USA) translatiert.

Anschließend wurden die Perlen intensiv mit Bindungspuffer gewaschen und die gebundenen Proteine mit SDS-Polyacrylamidgel-Puffer eluiert, auf einem SDS-Polyacrylamidgel getrennt und mittels Autoradiographie visualisiert.

## **2.9 „Overlay“-Verfahren**

Es handelt sich um ein weiteres Verfahren zur Untersuchung der Interaktion zwischen NHERF2 und TRPV5.

10 mg GST, GST-TRPV5 C-Terminus, GST-TRPV6 C-Terminus, GST-NHERF2 oder BSA wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf PVDF-Membranen übertragen. Die Membranen wurden dann für eine Stunde im Bindungspuffer 1 blockiert und anschließend mit  $^{35}\text{S}$ -NHERF2 oder  $^{35}\text{S}$ -TRPV5 für zwei Stunden bei Raumtemperatur im Bindungspuffer 2 inkubiert. Nach intensivem Waschen der Membranen erfolgte die Visualisierung der gebundenen Proteine mittels Autoradiographie.

## **2.10 Statistik**

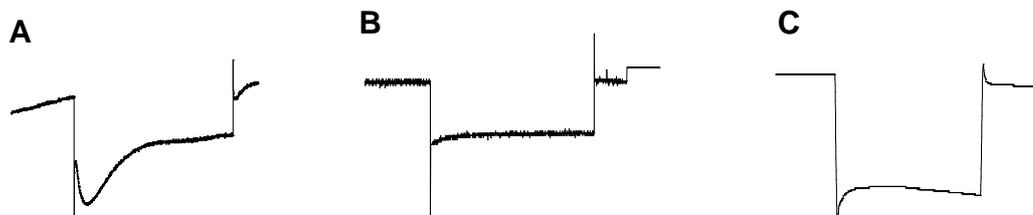
Die Daten stellen das arithmetische Mittel (mean) +/- des Standardfehlers des Mittelwertes (SEM: standard error of the mean) dar, wobei n die Anzahl der untersuchten Oozyten angibt. Die Werte wurden mit ANOVA (Varianzanalyse) auf Signifikanz geprüft.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 **Das Gerüstprotein NHERF2 benötigt die Proteinkinase<sup>S422D</sup>SGK1 um die Aktivität von TRPV5 zu stimulieren**

Es wurden Versuche an TRPV5-exprimierenden Oozyten durchgeführt, wobei deren Aktivität nach Koexpression von NHERF2 allein, <sup>S422D</sup>SGK1 allein und kombinierter Koexpression von NHERF2 und <sup>S422D</sup>SGK1 mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme gemessen wurde. Die Zugabe von 10 mM CaCl<sub>2</sub> induzierte einen Einwärtsstrom ( $I_{Cl(Ca)}$ ), welcher durch den Eintritt von Ca<sup>2+</sup>-Ionen und die dadurch bedingte Aktivierung von Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Cl<sup>-</sup>-Kanälen erzeugt wurde. *Xenopus laevis*-Oozyten enthalten mehrere Ca<sup>2+</sup>-abhängige Cl<sup>-</sup>-Kanäle, welche sich dazu eignen, Ca<sup>2+</sup>-Signale zu detektieren und zu verstärken. Sie reagieren sehr sensibel auf intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Veränderungen. Die gemessenen Cl<sup>-</sup>-Ströme zeigen eine lineare Abhängigkeit zur zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und zum Membranpotential.

Die Hyperpolarisation von -50 mV auf -110 mV in der Anwesenheit von 10 mM Ca<sup>2+</sup> führte in TRPV5 exprimierenden Oozyten zu einem schnell aktivierenden, langsam und partiell inaktivierenden Einwärtsstrom. In Wasser injizierten Oozyten hingegen führte die zytosolische Ca<sup>2+</sup>-Zunahme mittels des Ca<sup>2+</sup>-Ionophors Ionomycin (10 µM) zur Stimulation eines nicht-inaktivierenden Stroms. (Abb. 10)



**Abbildung 10:** TRPV5-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme stimulieren eine endogene Chlorid-Leitfähigkeit  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ ; in TRPV5 exprimierenden *Xenopus laevis*-Oozyten triggerte die Hyperpolarisation von -50 mV auf -110 mV in Anwesenheit von 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  einen schnell aktivierenden, langsam und partiell inaktivierenden Einwärtsstrom (A); in Wasserinjizierten Zellen führte die Hyperpolarisation hingegen zu keiner Zunahme der spannungsabhängigen Ströme (B); die Erhöhung des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  durch Zugabe des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophors Ionomycin (10  $\mu\text{M}$ ) führte zur Stimulation eines nicht-inaktivierenden Stroms (C)

Als Maß für die TRPV5-Aktivität wurde der Höchstwert des Einwärtsstroms benutzt.

Es zeigte sich, daß nur die Koexpression von  $\text{S}^{422\text{D}}$ SGK1 und NHERF2 in TRPV5-exprimierenden Oozyten eine Zunahme von  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  von 0,26 +/- 0,08  $\mu\text{A}$  auf 0,78 +/- 0,09  $\mu\text{A}$  bewirkte. Die alleinige Koexpression von NHERF2 bzw.  $\text{S}^{422\text{D}}$ SGK1 führte zu keiner signifikanten Erhöhung von  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ . (Abbildung 11).

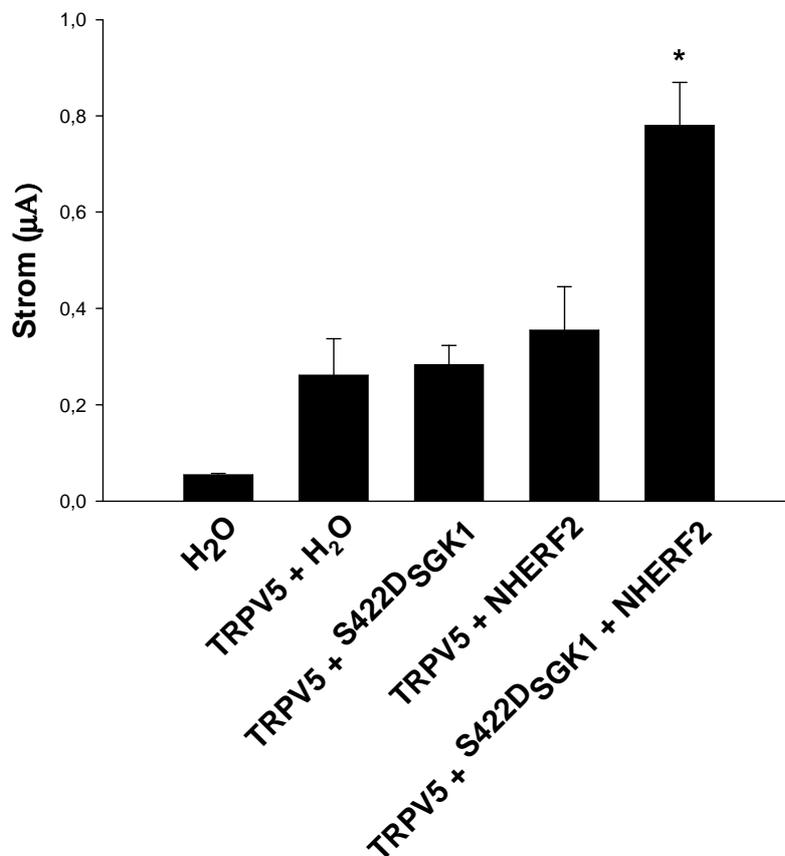
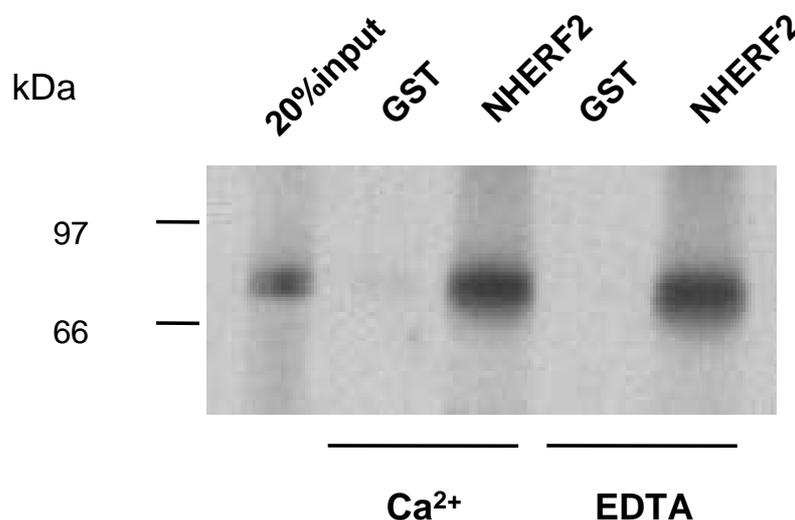


Abbildung 11: Stimulation der Ca-Ströme durch die Koexpression von TRPV5, <sup>S422D</sup>SGK1 und NHERF2;  $I_{Cl(Ca)}$  ist hierbei der maximale Einwärtsstrom in Anwesenheit von 10 mM  $CaCl_2$ ; nur die Koexpression von <sup>S422D</sup>SGK1 und NHERF2 in TRPV5-exprimierenden Oozyten führte zu einer Stimulation von  $I_{Cl(Ca)}$ ; (n=24, Oozyten von 3 Tieren); \* kennzeichnet einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen *Xenopus*-Oozyten, die TRPV5 zusammen mit <sup>S422D</sup>SGK1 und NHERF2 exprimieren und Oozyten, die TRPV5 alleine exprimieren

### 3.2 NHERF2 interagiert mit dem C-Terminus von TRPV5

Um zu untersuchen, ob die durch NHERF2 und <sup>S422D</sup>SGK1 bedingte Aufregulierung der TRPV5-Aktivität durch eine Interaktion zwischen NHERF2 und TRPV5 vermittelt wird, wurden GST-„Pull-down“- und „Overlay“-Experimente durchgeführt.

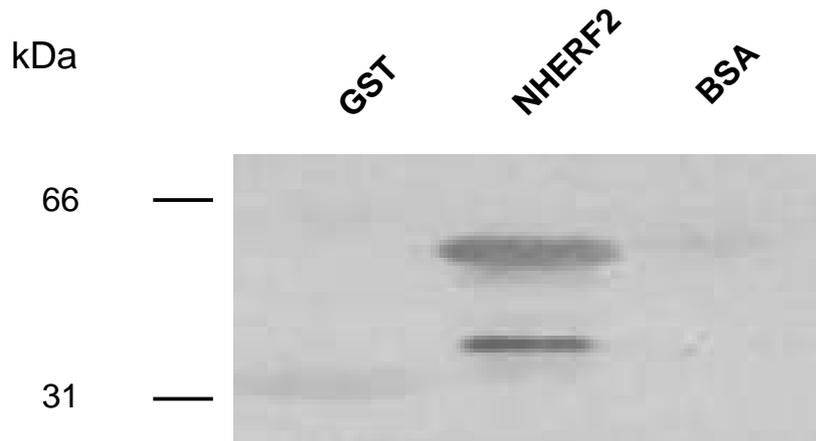
Für die „Pulldown“-Experimente wurde das TRPV5-Protein durch *in vitro*-Transkription/Translation mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert und dessen Interaktion mit NHERF2 unter *in vitro*-Bedingungen untersucht. Wie Abbildung 12 zeigt, interagiert TRPV5 nur mit dem GST-NHERF2-Fusionsprotein, nicht aber mit GST alleine. Die Bindung erfolgte  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig, sowohl unter Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  (1 mM), als auch unter dessen Abwesenheit (2 mM EDTA).



**Abbildung 12: Interaktion von NHERF2 mit TRPV5; GST-NHERF2-Fusionsprotein wurde auf Glutathion-Sepharose 4B Perlen immobilisiert und mit *in vitro*-translatiertem  $^{35}\text{S}$ -Methionin-TRPV5 inkubiert; die Visualisierung der Proteinbindungen erfolgte durch Autoradiographie; TRPV5 interagiert nur mit GST-NHERF2, nicht aber mit GST alleine; die Bindung erfolgte  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig**

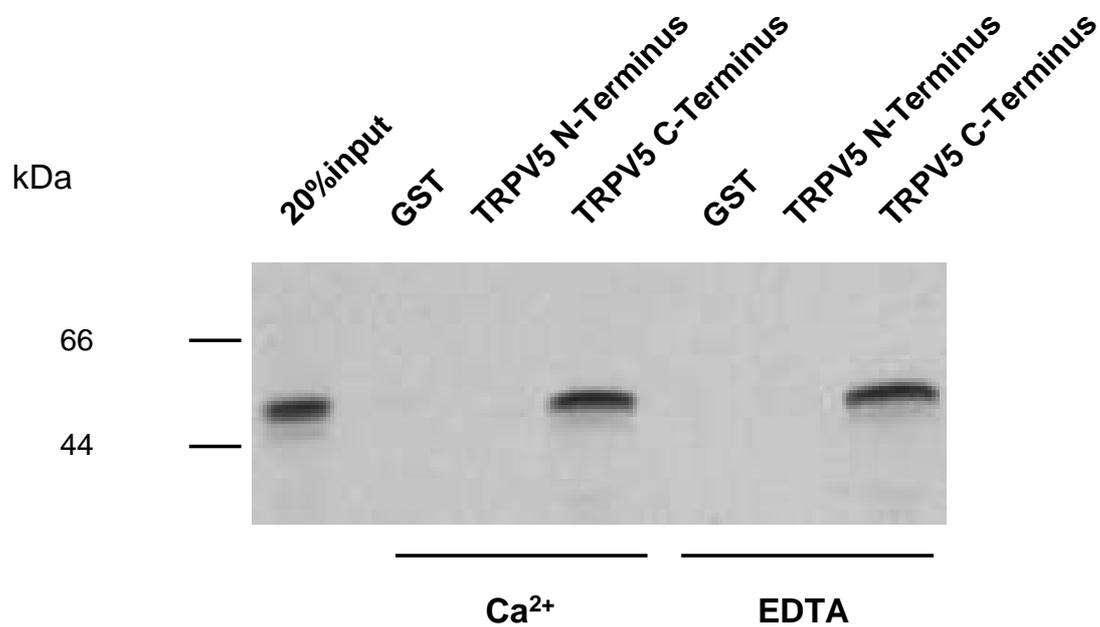
Zur Überprüfung der Ergebnisse wurden zusätzlich „Overlay“-Verfahren durchgeführt. Wie in Abbildung 13 ersichtlich, interagiert  $^{35}\text{S}$ -Methionin-

markiertes TRPV5 nur mit dem Fusionsprotein GST-NHERF2, nicht aber mit GST alleine oder mit BSA.



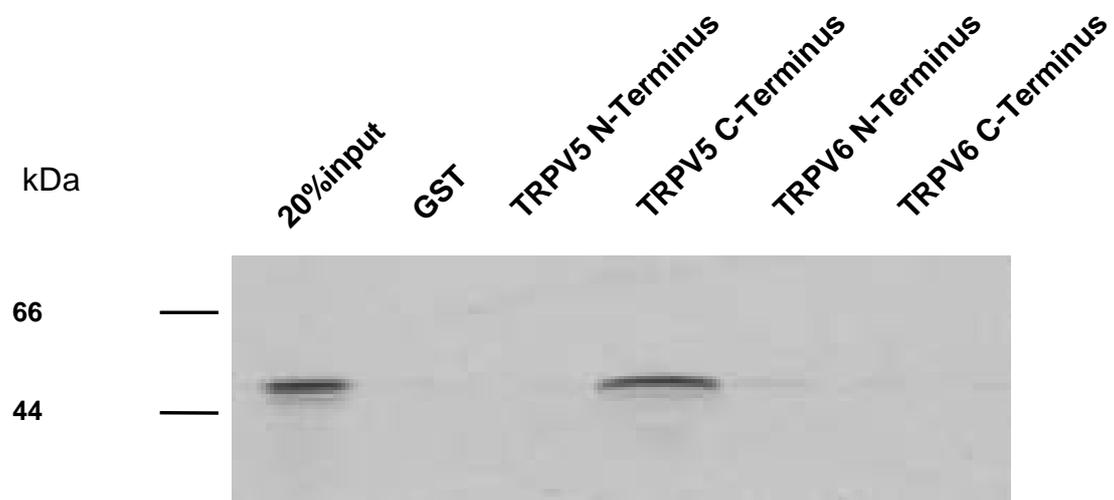
**Abbildung 13: Interaktion von NHERF2 mit TRPV5; GST-NHERF2-Fusionsprotein wurde auf PVDF-Membranen übertragen und mit *in vitro*-translatiertem <sup>35</sup>S-Methionin-TRPV5 inkubiert; die Visualisierung der Proteinbindungen erfolgte durch Autoradiographie; TRPV5 interagiert nur mit GST-NHERF2, nicht aber mit GST oder BSA**

Anschließend wurde untersucht, ob der Amino (N)- oder der Carboxyl (C)-Terminus von TRPV5 an der Bindung mit NHERF2 beteiligt ist. Die beiden Termini von TRPV5 wurden mittels PCR amplifiziert. Dann wurden GST-Fusionsproteine, die entweder den N- oder den C-Terminus von TRPV5 umfaßten, mit <sup>35</sup>S-Methionin-markiertem NHERF2 inkubiert. Wie Abbildung 14 zeigt, interagiert NHERF2 nur mit dem C-Terminus, nicht aber mit dem N-Terminus von TRPV5. Auch diese Proteinbindung erfolgte Ca<sup>2+</sup>-unabhängig.



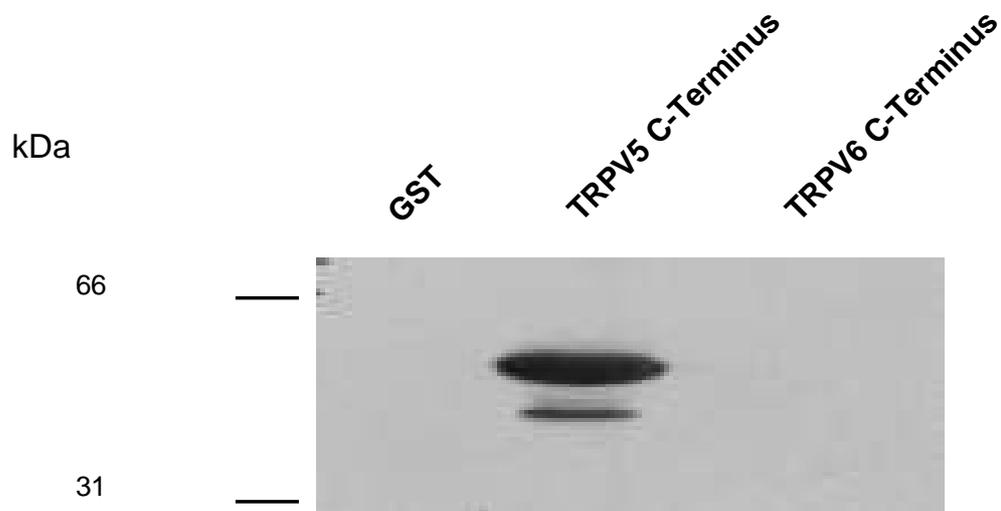
**Abbildung 14:** Interaktion zwischen NHERF2 und TRPV5 vermittelt durch den C-Terminus von TRPV5; GST-Fusionsproteine, die entweder den N- oder den C-Terminus von TRPV5 umfaßten, wurden auf Glutathion-Sepharose 4B Perlen immobilisiert und mit *in vitro*-translatiertem  $^{35}S$ -Methionin-NHERF2 inkubiert; die Visualisierung der Proteinbindungen erfolgte durch Autoradiographie; NHERF2 interagiert nur mit dem C-Terminus von TRPV5, nicht aber mit dessen N-Terminus; die Bindung erfolgte  $Ca^{2+}$ -unabhängig

Um die Spezifität der NHERF2/TRPV5-Bindung zu überprüfen, wurden „Pull-down“-Experimente mit der TRPV-Isoform TRPV6 durchgeführt. Dabei zeigte sich, wie in Abbildung 15 ersichtlich, daß weder der C- noch der N-Terminus von TRPV6 mit  $^{35}S$ -Methionin-markiertem NHERF2 interagierten.



**Abbildung 15: Spezifität der NHERF2/TRPV5-Bindung; GST-Fusionsproteine, die entweder den N- oder C-Terminus von TRPV5 bzw. TRPV6 umfaßten, wurden auf Glutathion-Sepharose 4B Perlen immobilisiert und mit *in vitro*-translatiertem <sup>35</sup>S-Methionin-NHERF2 inkubiert; die Visualisierung der Proteinbindungen erfolgte durch Autoradiographie; nur der C-Terminus von TRPV5 interagiert mit NHERF2, nicht aber dessen N-Terminus noch beide Termini von TRPV6**

Zur Überprüfung der Ergebnisse wurden zusätzlich „Overlay“-Verfahren durchgeführt. Diese bestätigten die Spezifität der Bindung zwischen <sup>35</sup>S-Methionin-markiertem NHERF2 und dem C-Terminus von TRPV5. (s. Abbildung 16)



**Abbildung 16: Spezifität der NHERF2/TRPV5-Bindung; GST-Fusionsproteine, die den C-Terminus von TRPV5 bzw. TRPV6 umfaßten, wurden auf PVDF-Membranen übertragen und mit *in vitro*-translatiertem <sup>35</sup>S-Methionin-NHERF2 inkubiert; die Visualisierung der Proteinbindungen erfolgte durch Autoradiographie; nur der C-Terminus von TRPV5 interagiert mit NHERF2, nicht aber der C-Terminus von TRPV6**

### **3.3 Die 2. PDZ-Domäne auf NHERF2 wird für die Stimulation der TRPV5-Aktivität durch <sup>S422D</sup>SGK1 und NHERF2 benötigt**

Des Weiteren wurden Versuche durchgeführt, um die PDZ-Domäne zu identifizieren, welche für die Stimulation von TRPV5 durch <sup>S422D</sup>SGK1 und NHERF2 verantwortlich ist.

Hierzu wurden TRPV5-exprimierende Oozyten verwendet, deren Aktivität nach Koexpression von <sup>S422D</sup>SGK1 und Wildtyp-NHERF2, <sup>S422D</sup>SGK1 und NHERF2 ohne die 2. PDZ-Domäne (NHERF2 $\Delta$ P2) und <sup>S422D</sup>SGK1 und NHERF2 ohne die 1. PDZ-Domäne (NHERF2 $\Delta$ P1) mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme und dem Lumineszenzverfahren gemessen wurde. Wie in Abbildung 17 ersichtlich, erhöhte sich die TRPV5-Aktivität nach Koexpression sowohl von <sup>S422D</sup>SGK1 und Wildtyp-NHERF2 (von 1,90 +/- 0,44  $\mu$ A auf 7,04 +/- 0,83  $\mu$ A, n=15) als auch von <sup>S422D</sup>SGK1 und NHERF2 ohne die 1. PDZ-Domäne (NHERF2 $\Delta$ P1) (von 1,90 +/- 0,44  $\mu$ A auf 6,0 +/- 0,81  $\mu$ A, n=14, 3 Tiere). Nach Koexpression von <sup>S422D</sup>SGK1 und NHERF2 ohne die 2. PDZ-Domäne (NHERF2 $\Delta$ P2) kam es hingegen zu keiner signifikanten Erhöhung der TRPV5-Aktivität. Folglich wird für die Stimulation der TRPV5-Aktivität die zweite PDZ-Domäne von NHERF2 benötigt.

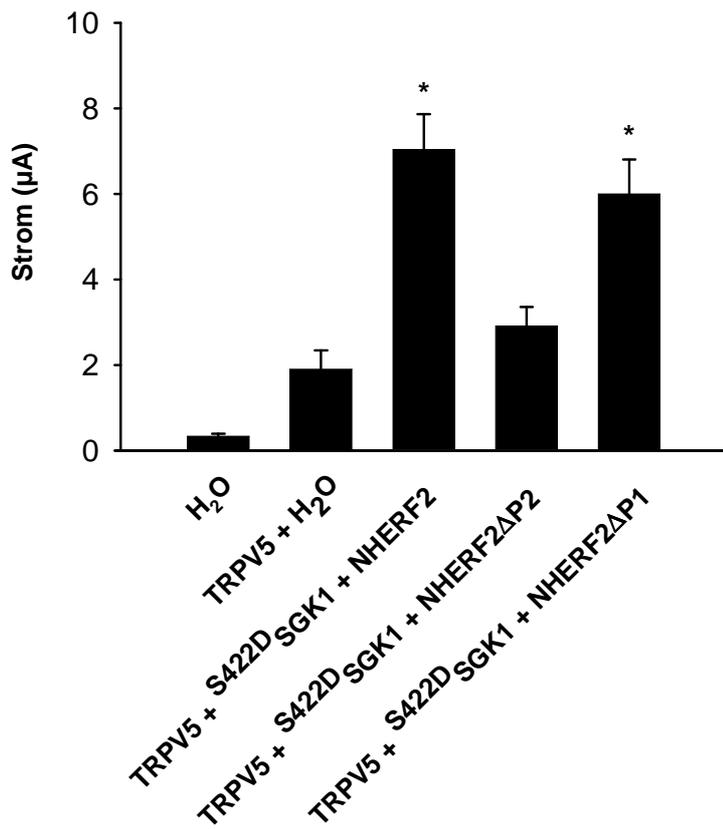


Abbildung 17: Notwendigkeit der zweiten PDZ-Domäne von NHERF2 für die Stimulation der TRPV5-Aktivität durch <sup>S422D</sup>SGK1; *Xenopus laevis*-Oozyten wurden mit H<sub>2</sub>O oder cRNA injiziert, welche TRPV5 alleine oder mit <sup>S422D</sup>SGK1 und entweder Wildtyp-NHERF2, NHERF2 ohne die 2. PDZ-Domäne (NHERF2ΔP2) oder NHERF2 ohne die 1. PDZ-Domäne (NHERF2ΔP1) kodierte; der Strom I<sub>Cl(Ca)</sub> erhöhte sich nur nach Koexpression von <sup>S422D</sup>SGK1 mit Wildtyp-NHERF2 oder NHERF2ΔP1; \* kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zwischen *Xenopus*-Oozyten, die TRPV5 zusammen mit <sup>S422D</sup>SGK1 und NHERF2 bzw. NHERF2 ΔP1 exprimieren und Oozyten, die TRPV5 alleine exprimieren

### **3.4 Die SGK1-Konsensussequenz auf TRPV5 ist für die Stimulation von TRPV5 durch <sup>S422D</sup>SGK1 und NHERF2 notwendig**

Anschließend wurde untersucht, ob die Stimulation der TRPV5-Aktivität durch <sup>S422D</sup>SGK1 und NHERF2 durch eine direkte Phosphorylierung von TRPV5 bedingt ist. TRPV5 besitzt, wie in Kapitel 1.3.1 dargestellt, eine SGK1-Konsensussequenz auf Threonin 709. Durch zielgerichtete Mutagenese wurde eine TRPV5-Mutante hergestellt, bei der Threonin 709 durch Alanin ersetzt ist (<sup>T709A</sup>TRPV5). Mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme wurden Untersuchungen an Oozyten durchgeführt, die mit H<sub>2</sub>O injiziert wurden oder mit cRNA, die TRPV5 bzw. <sup>T709A</sup>TRPV5 allein oder jeweils mit <sup>S422D</sup>SGK1 und NHERF2 kodierte. Dabei zeigte sich (Abbildung 18), daß nur die Koexpression von <sup>S422D</sup>SGK1 und NHERF2 mit Wildtyp-TRPV5 zu einer Zunahme von I<sub>Cl(Ca)</sub> führte. Die Koexpression von <sup>S422D</sup>SGK1 und NHERF2 mit <sup>T709A</sup>TRPV5 hingegen hatte keinen Einfluß auf I<sub>Cl(Ca)</sub>.

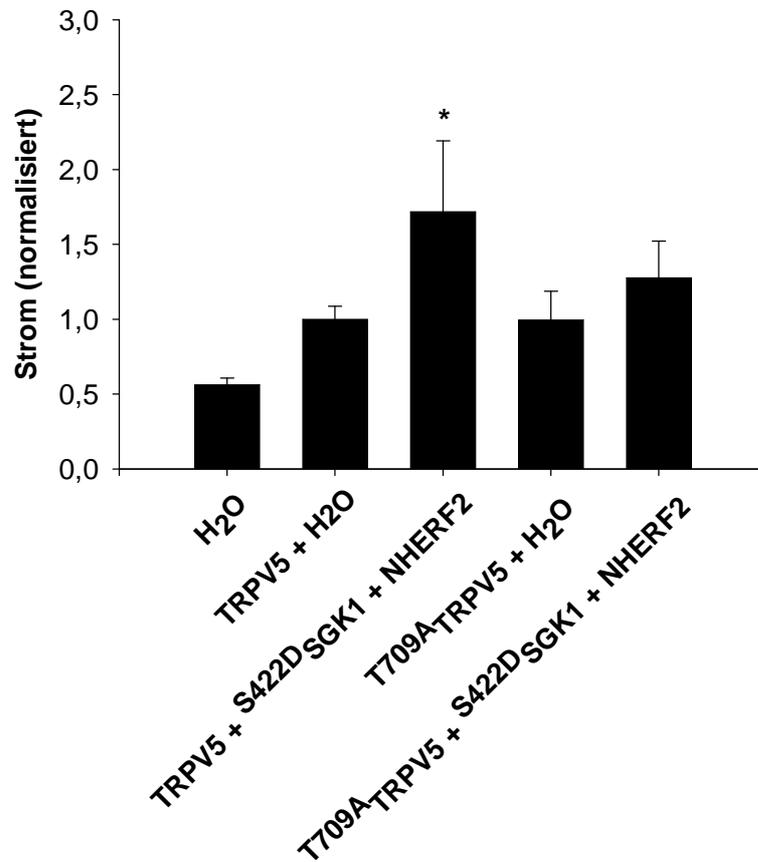


Abbildung 18: Die Stimulation der TRPV5-Aktivität durch <sup>S422D</sup>SGK1 und NHERF2 wird durch die SGK1-Phosphorylierungsstelle auf Threonin 709 vermittelt; *Xenopus laevis*-Oozyten wurden untersucht, die mit H<sub>2</sub>O injiziert wurden oder mit cRNA, die entweder TRPV5 bzw. <sup>T709A</sup>TRPV5 alleine oder jeweils mit <sup>S422D</sup>SGK1 und NHERF2 kodierte; dabei zeigte sich, daß nur die Koexpression von <sup>S422D</sup>SGK1 und NHERF2 mit Wildtyp-TRPV5 zu einer Steigerung der TRPV5-Aktivität führte (n=25-27); \* kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zwischen *Xenopus*-Oozyten, die TRPV5 zusammen mit <sup>S422D</sup>SGK1 und NHERF2 exprimieren und Oozyten, die TRPV5 alleine exprimieren

### **3.5 Die Koexpression von <sup>S422D</sup>SGK1 und NHERF2 erhöht die Plasmamembranabundanz von TRPV5**

PDZ-Domänen verknüpfen Proteine an das Zytoskelett und können die Zielsteuerung (Targeting) oder Stabilisierung von Transportproteinen an die Zellmembran bewirken. Um zu unterscheiden, ob die Stimulation der TRPV5-Aktivität durch Zielsteuerung des Proteins oder durch veränderte Kanaleigenschaften bedingt ist, wurde die Oberflächenexpression von TRPV5 anhand von Lumineszenzmessungen parallel zu Messungen mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme untersucht.

Wie Abbildung 19 zeigt, erhöhten sich sowohl die Oberflächenexpression als auch die Ströme nach Koexpression an TRPV5-exprimierenden Oozyten von <sup>S422D</sup>SGK1 und Wildtyp-NHERF2, verglichen mit der TRPV5-Kontrollgruppe. Dabei kam es zu einer 4,4-fachen Steigerung der TRPV5-Oberflächenexpression und einer Zunahme von  $I_{Cl(Ca)}$  von 1,87 +/- 0,41  $\mu A$  (n=21) auf 7,01 +/- 1,27  $\mu A$  (n=20).

Außerdem ist in Abbildung 19 ersichtlich, daß die TRPV5-Oberflächenexpression nach Koexpression von <sup>S422D</sup>SGK1 und NHERF2 $\Delta$ P1 um das 3,5-fache gesteigert wurde. Die Koexpression von <sup>S422D</sup>SGK1 und NHERF2 $\Delta$ P2 hingegen hatte weder auf die Plasmamembranabundanz von TRPV5 noch auf die gemessenen Ströme (TRPV5-Kontrollgruppe: 1,87 +/- 0,41  $\mu A$  (n=21), TRPV5/ <sup>S422D</sup>SGK1/NHERF2 $\Delta$ P2-Gruppe: 2,42 +/- 0,41  $\mu A$  (n=20, 3 Tiere) Einfluß.

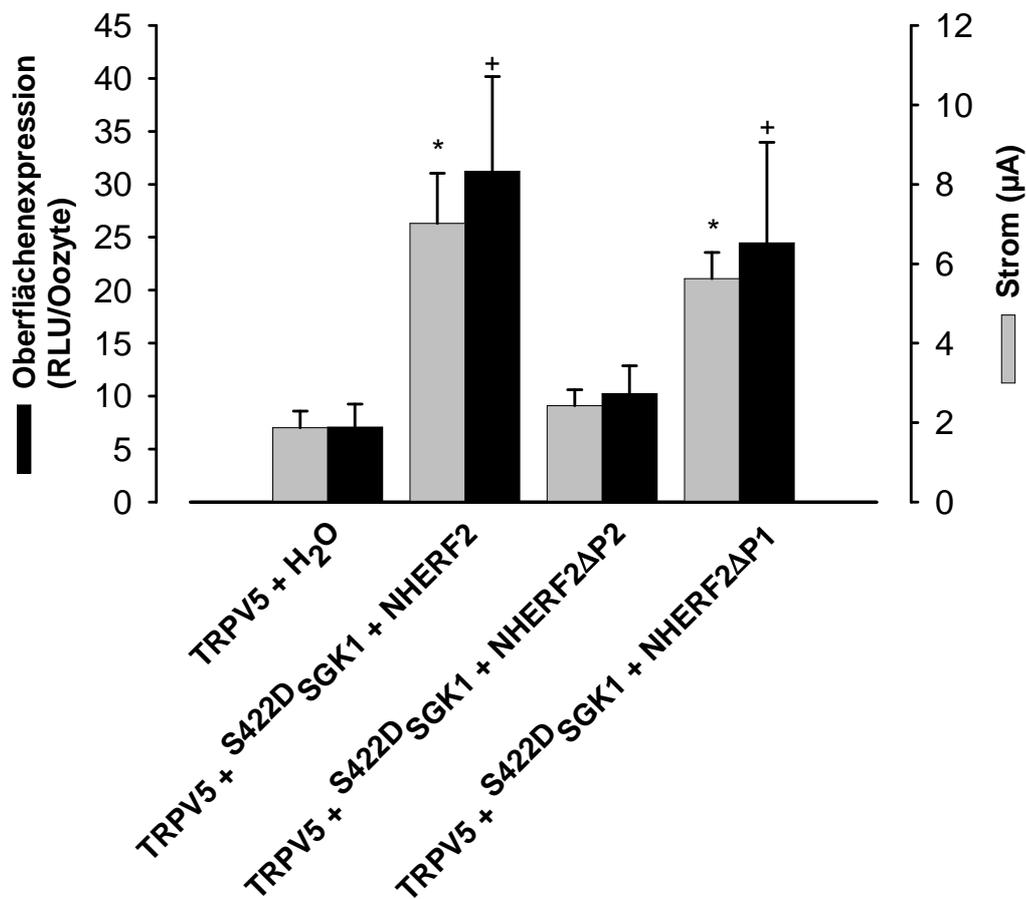


Abbildung 19: Notwendigkeit der zweiten PDZ-Domäne von NHERF2 für die Stimulation der TRPV5-Oberflächenexpression durch <sup>S422D</sup>SGK1; *Xenopus laevis*-Oozyten wurden mit H<sub>2</sub>O oder cRNA injiziert, welche TRPV5 alleine oder mit <sup>S422D</sup>SGK1 und entweder Wildtyp-NHERF2, NHERF2 ohne die 2. PDZ-Domäne (NHERF2ΔP2) oder NHERF2 ohne die 1. PDZ-Domäne (NHERF2ΔP1) kodierte; die Plasmamembranabundanz von TRPV5 erhöhte sich nur nach Koexpression von <sup>S422D</sup>SGK1 mit Wildtyp-NHERF2 oder NHERF2ΔP1 (n=20-29, 3 Tiere); \* und + kennzeichnen einen signifikanten Unterschied zwischen *Xenopus*-Oozyten, die TRPV5 zusammen mit <sup>S422D</sup>SGK1 und NHERF2 bzw. NHERF2 ΔP1 exprimieren und Oozyten, die TRPV5 alleine exprimieren

Abbildung 20 veranschaulicht deutlich die Korrelation zwischen der gemessenen Oberflächenexpression und den TRPV5-Strömen.

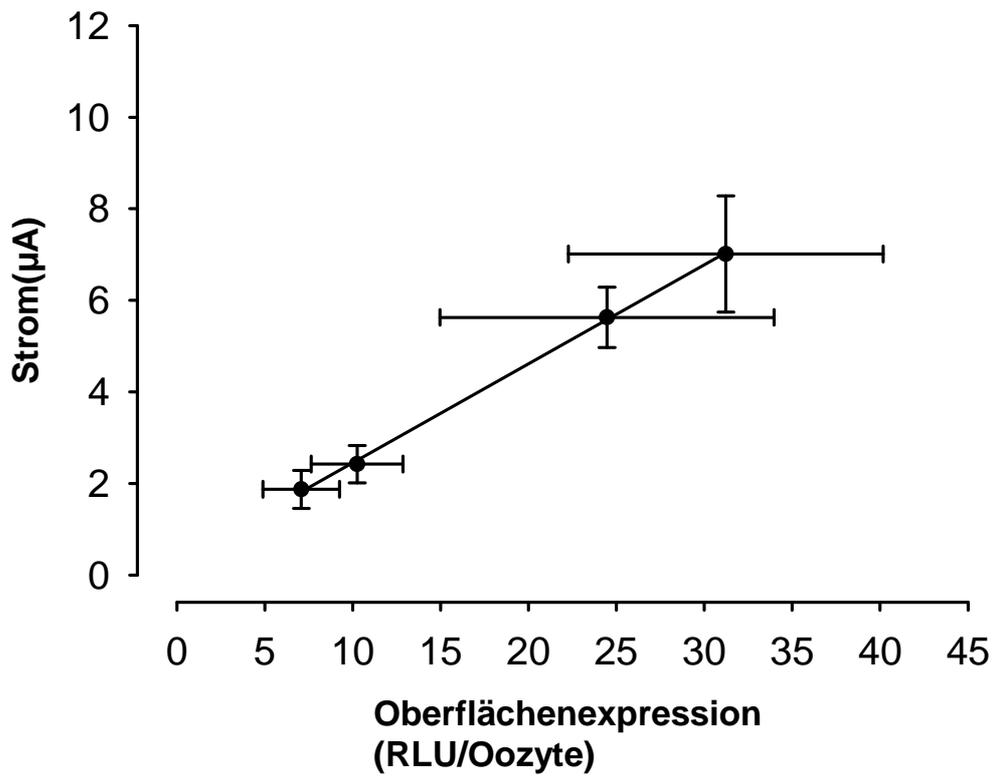


Abbildung 20: Die Oberflächenexpression korreliert mit den TRPV5-Strömen (n=20-29, 3 Tiere)

## 4 Diskussion

### 4.1 Ergebnisdiskussion

Ziel unserer Untersuchungen war es, weitere Erkenntnisse über die Regulation des für den Calciumhaushalt wichtigen epithelialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal TRPV5 zu erhalten. Dabei galt es, zunächst herauszufinden, ob TRPV5 ähnlich dem  $\text{K}^{+}$ -Kanal ROMK1 durch das Gerüstprotein NHERF2 und die Proteinkinase  $\text{S}^{422\text{D}}$ SGK1 stimuliert werden kann.

#### 4.1.1 Das Gerüstprotein NHERF2 benötigt die Proteinkinase $\text{S}^{422\text{D}}$ SGK1 zur Stimulation von TRPV5

In der Niere konnten TRPV5, NHERF2 und SGK1 in Prinzipalzellen des Sammelrohrs nachgewiesen werden (45;61;104). Wie in Kapitel 1.3.1 erwähnt, besitzt TRPV5 an jedem Terminus jeweils ein PDZ-Bindungsmotiv, welches mit einer PDZ-Domäne von NHERF2 interagieren könnte. Untersuchungen an dem  $\text{K}^{+}$ -Kanal ROMK1 zeigten, daß dieser durch eine Koexpression von SGK1 und NHERF2 aktiviert wurde (115). Daraufhin wurde angenommen, daß dieser Mechanismus auch eine Aktivierung von TRPV5 bewirken könnte.

Die von uns durchgeführten Versuche mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme zeigten dementsprechend eine Aufregulation von TRPV5 durch  $\text{S}^{422\text{D}}$ SGK1 und NHERF2. Der Eintritt von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch TRPV5 bewirkte hierbei eine Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{Cl}^{-}$ -Kanälen, gemessen als  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ . In weiteren Versuchen (30) konnte bestätigt werden, daß die Zunahme von  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  tatsächlich auf einer Aktivierung von TRPV5 beruhte und nicht auf einer Modulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{Cl}^{-}$ -Kanäle. Die Zugabe des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophors Ionomycin erhöhte die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in wasserinjizierten Oozyten und führte zu einer Aktivierung eines nicht-inaktivierenden  $\text{Cl}^{-}$ -Stromes. Dieser Ionomycin-induzierte Strom wurde allerdings nicht durch  $\text{S}^{422\text{D}}$ SGK1 und NHERF2 verstärkt.

#### **4.1.2 NHERF2 interagiert durch seine 2. PDZ-Domäne mit dem C-Terminus von TRPV5**

Weiterhin ließ sich nachweisen, daß NHERF2 mit dem C-Terminus von TRPV5 interagiert. Dabei handelt es sich um eine spezifische Bindung, denn „Pull-down“- und „Overlay“-Verfahren zeigten, daß weder der N-Terminus von TRPV5 noch beide Termini von TRPV6 eine Bindung mit NHERF2 eingehen konnten. Mittels elektrophysiologischer und Lumineszenzmessungen fanden wir heraus, daß die zweite PDZ-Domäne von NHERF2 für die Aktivierung von TRPV5 durch <sup>S422D</sup>SGK1 und NHERF2 benötigt wird. NHERF2 interagiert mit SGK1 über die zweite PDZ-Domäne (114). Das Fehlen dieser Domäne könnte demnach dazu führen, daß die NHERF2-Mutante NHERF2 $\Delta$ P2 nicht dazu in der Lage ist, als Gerüstprotein die Proteinkinase SGK1 in die Nähe von TRPV5 zu bringen. Dadurch könnte SGK1 unfähig sein, TRPV5 zu binden und zu phosphorylieren.

#### **4.1.3 Die SGK1-Konsensussequenz auf TRPV5 ist für dessen Stimulation durch NHERF2 und <sup>S422D</sup>SGK1 notwendig**

Es zeigte sich darüber hinaus, daß der SGK1-aktivierende Effekt nur gegeben war, wenn deren katalytische Domäne intakt war, wohingegen die inaktive Mutante <sup>K127N</sup>SGK1 in Anwesenheit von NHERF2 zu keiner Stimulation von TRPV5 führte (30). Dies bedeutet, daß die Kinase vermutlich durch eine Phosphorylierung ihres Zielproteins wirksam ist. Yun und Mitarbeiter berichteten, daß SGK1 mit beiden PDZ-Domänen von NHERF2 interagieren kann, wobei die Bindung an die zweite PDZ-Domäne allerdings um ein Vielfaches stärker ist (114). Bisher unveröffentlichte Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, daß SGK1 NHERF2 nicht phosphorylieren kann. Da TRPV5 eine putative SGK1-Konsensussequenz (R-R-x-S/T) auf Threonin 709

besitzt, könnte SGK1 TRPV5 phosphorylieren und dadurch stimulieren. Die direkte Phosphorylierung von TRPV5 durch SGK1 wurde in dieser Arbeit nicht nachgewiesen. Allerdings zeigen unsere Ergebnisse, daß die Mutante <sup>T709A</sup>TRPV5, deren putative SGK1-Phosphorylierungsstelle durch Austausch der Aminosäure Threonin in Position 709 durch Alanin zerstört wurde, nicht durch <sup>S422D</sup>SGK1 und NHERF2 stimuliert werden konnte. Dies deutet auf eine entscheidende Rolle der Phosphorylierung von Threonin 709 in Bezug auf die Regulation von TRPV5 durch <sup>S422D</sup>SGK1 und NHERF2 hin.

#### **4.1.4 Die Koexpression von NHERF2 und <sup>S422D</sup>SGK1 erhöht die Plasmamembranabundanz von TRPV5**

Der stimulatorische Effekt benötigt neben <sup>S422D</sup>SGK1 noch NHERF2. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, handelt es sich bei NHERF2 um ein Gerüstprotein, welches miteinander korrespondierende Signalproteine zu einem Signalkomplex organisieren kann. Darüber hinaus kann es auch die Zielsteuerung (Targeting) von Ionenkanälen vermitteln (2;48). Unsere Ergebnisse zeigen, daß die Aktivierung von TRPV5 durch <sup>S422D</sup>SGK1 und NHERF2 durch eine erhöhte Plasmamembranabundanz von TRPV5 bedingt ist. Demnach bewirkt NHERF2 die Zielsteuerung und Stabilisierung von TRPV5 in der Plasmamembran. NHERF2 interagiert mit SGK1 (114). Dies deutet darauf hin, daß NHERF2 als Gerüstprotein wirkt, das SGK1 in unmittelbare Nähe zu TRPV5 bringen kann, um den Kanal auf Threonin 709 zu phosphorylieren.

## 4.2 Fehlerdiskussion

### 4.2.1 Oozytenpräparation

Wie in Kapitel 1.6 erwähnt, ist *Xenopus laevis* ein wichtiges Labortier in der Forschung der Zell- und Molekularbiologie, wobei seine Oozyten als bewährtes Expressionssystem der zu untersuchenden Ionenkanäle oder Transporter fungieren. Die *in vitro* synthetisierte cRNA wird in eine Oozyte injiziert, woraufhin es zur Expression des entsprechenden Proteins kommt (24;39). Hierbei bestehen mehrere Fehlerquellen.

Zum einen wiesen die von uns verwendeten Oozyten zum Teil erhebliche Qualitätsunterschiede auf. Bedingt war dies durch die Individualität der Frösche und der Oozytenpräparation mittels Kollagenasenverdau. Bei der Selektion der Oozyten wurde deshalb darauf geachtet, daß nur Oozyten der gleichen Größe verwendet wurden und solche mit bereits sichtbaren Zellalterationen sofort aussortiert wurden. Oozyten mit latenten Membranschäden, welche nicht bereits der ersten Selektion zum Opfer gefallen waren, konnten bei Versuchen mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme durch Veränderungen der Größe ihres Ausgangsmembranpotentials und des basalen Leckstroms identifiziert und aussortiert werden. Eine intakte Oozyte sollte ein Ruhemembranpotential zwischen -30 und -70 mV besitzen.

Eine weitere Fehlerquelle stellte die cRNA-Injektion dar. Sowohl bei der Injektionsmenge je Oozyt wie auch bei der jeweiligen Konzentration der Injektionslösung mußte von minimalen Differenzen ausgegangen werden. Die cRNA wurden als Stammlösungen aufbewahrt und aus diesen wurden die benötigten Konzentrationen durch Verdünnung hergestellt. Hierbei wurde im Mikroliterbereich gearbeitet, wobei geringfügige Konzentrationsunterschiede nicht zu vermeiden waren. Um Kontaminationen der verwendeten cRNA zu verhindern, fand der Injektionsvorgang unter semisterilen Bedingungen statt.

Darüber hinaus konnten sich ferner Schwankungen der Raumtemperatur oder Qualitätsunterschiede der Aufbewahrungslösungen auf die Meßergebnisse auswirken. Um derartig induzierte Unterschiede möglichst auszugleichen, wurden jeweils mehrere Versuchsreihen durchgeführt mit Oozyten von mindestens 3 Tieren.

Zu berücksichtigen ist auch, daß *Xenopus laevis*-Oozyten endogene Proteine enthalten können, die gegebenenfalls mit den zu untersuchenden Proteinen interagieren könnten. Dies könnte zu Ergebnisverfälschungen führen. Allerdings ist die Expression endogener Proteine in *Xenopus laevis*-Oozyten generell sehr gering im Vergleich zu den heterolog exprimierten Proteinen (24). Dennoch können Messungen, die an Oozyten gewonnen wurden, nicht ohne weiteres auf mammalische Zellen übertragen werden, da intrazelluläre Signalwege zwischen den beiden Zellreihen differieren können.

#### **4.2.2 Lösungen und Geräte**

Die verwendeten Lösungen wurden meistens als Stammlösungen hergestellt und vor den Versuchen auf die jeweilige Konzentration verdünnt. Dabei wurde auf genaue Abmessungen geachtet und der pH-Wert und die Osmolarität der Lösungen regelmäßig überprüft.

Bei der Lumineszenzmessung wurde selbstverständlich darauf geachtet, daß der Zeitpunkt zwischen der Zugabe des Lumineszenzsubstrats zu den zu untersuchenden Oozyten und dem Beginn des Meßvorgangs mittels des Luminometers so gering wie möglich gehalten wurde. Um Unterschiede auszugleichen, wurden jeweils mehrere Versuchsreihen durchgeführt mit Oozyten von mindestens 3 Tieren.

Der Versuchsaufbau der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme wurde durch einen Faradayschen Käfig geschützt, um die Meßvorgänge von externen elektrischen Schwingungen abzuschirmen. Um mechanische Erschütterungen zu vermeiden, wurde ein schwingungsarmer Tisch als Unterlage verwendet. Es

wurde darauf geachtet, daß die Durchflußgeschwindigkeit konstant 20 ml/min betrug, wobei ein kompletter Austausch der Badlösung nach 10 s erreicht wurde. Dies wurde durch regelmäßiges Durchspülen der verwendeten Perfusionssysteme mit 70%igem Ethanol und destilliertem H<sub>2</sub>O gewährleistet. Veränderungen der Durchflußgeschwindigkeit konnten zu Membranschäden führen.

Die verwendeten Meßelektroden besaßen eine Beschichtung, die sich im Verlauf abnutzte. Da dies zu einer Erhöhung des Elektrodenwiderstands führte, wurden die Elektroden vor jeder Versuchsreihe neu chloriert. Die Glaskapillaren, in die die Elektroden eingebracht wurden, konnten während einer Versuchsreihe abbrechen oder verstopfen und so zu Widerstandserhöhungen führen, was Ergebnisverfälschungen zur Folge hätte. Um dies zu verhindern, wurde vor jeder Messung neben der optischen Kontrolle der Kapillaren der Elektrodenwiderstand überprüft. Bei großen Abweichungen wurde ein Wechsel der Glaskapillaren durchgeführt.

#### **4.3 Perspektiven**

TRPV5 bildet den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des renalen epithelialen transzellulären Ca<sup>2+</sup>-Transports (48;100) und ermöglicht dadurch die Feinregulation der Ca<sup>2+</sup>-Resorption und damit des Ca<sup>2+</sup>-Gleichgewichts im Körper. Dieser aktive Transport wird durch eine Vielzahl an Hormonen kontrolliert, dazu gehören PTH (6;32), 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D<sub>3</sub> (6;33;44;46;98), Kalzitonin (36), Östrogen (96) und Androgen (81). Die Sekretion von PTH erfolgt durch die Nebenschilddrüsen und wird durch die Plasma-Ca<sup>2+</sup>-Konzentration reguliert. Die PTH-sezernierenden Zellen besitzen an ihrer Oberfläche einen Ca<sup>2+</sup>-Meßfühler, der durch eine Erhöhung der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Serum aktiviert wird und mit einer Hemmung der PTH-Sekretion verbunden ist (15;97). Mutationen dieses Meßfühlers können zu Erkrankungen wie der familiären hypocalciurischen Hypercalcämie (FHH), dem

neonatalen schweren Hyperparathyreoidismus (NSHPT) oder der autosomal-dominanten Hypocalcämie führen (82;83). Die entsprechenden Symptome dieser Krankheiten sowie auch andere Formen des Hyper- und Hypoparathyreoidismus betreffen auch die Niere und demnach die renale  $\text{Ca}^{2+}$ -Resorption durch TRPV5. PTH stimuliert die renale  $\text{Ca}^{2+}$ -Resorption durch eine koordinierte Expression der daran beteiligten Proteine, wobei TRPV5 eine besondere Stellung einnimmt. Denn die Aufregulation von TRPV5 mit dem dadurch erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom erleichtert die Expression der nachfolgenden Proteine (97). Mahon und Mitarbeiter zeigten 2002, daß NHERF2 über eine PDZ-Domänen-Interaktion PTH1R (Parathormon-1-Rezeptor) binden kann und damit eine Rolle in der Signalübertragung von Parathormon einnimmt (63). Es könnte demnach sein, daß PTH über NHERF2 die Aktivität von TRPV5 reguliert. Dazu wäre allerdings nach unseren Ergebnissen SGK1 notwendig. SGK1 wird unter anderem durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -Vitamin  $\text{D}_3$  stimuliert (1). Das PTH-bedingte Sinken des Phosphatspiegels führt durch Stimulation der renalen  $1\alpha$ -Hydroxylase zu einer gesteigerten Synthese von  $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -Vitamin  $\text{D}_3$  (Kalzitriol) (14;43;87). Könnte SGK1 über die durch PTH gesteigerte Synthese von  $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -Vitamin  $\text{D}_3$  nachfolgend transkriptionell aufreguliert werden und damit an der oben vorgeschlagenen TRPV5-Aktivierung durch PTH über NHERF2 beteiligt sein? Van Abel und Mitarbeiter fanden heraus, daß Parathyroidektomie und PTH-Ergänzung keinen Effekt auf Vitamin-D-Rezeptor-mRNA-Werte hatten (97). Die Vitamin  $\text{D}_3$ -Antwort der Zielorgane ist allerdings von der Vitamin-D-Rezeptor-Fülle abhängig (14). Sie postulierten daraufhin, daß PTH die renale  $\text{Ca}^{2+}$ -Resorption über die Aufregulation der Expression der beteiligten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport-Proteine wie TRPV5 unabhängig von  $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -Vitamin  $\text{D}_3$  stimuliert. Dies würde die oben aufgeworfene Frage eher verneinen. SGK1 könnte eventuell auch direkt durch PTH stimuliert werden und so für die Aktivierung von TRPV5 durch PTH über NHERF2 vorhanden sein. Zur Klärung dieser Frage wären weitere Untersuchungen notwendig.

Eine chronische metabolische oder respiratorische Azidose führt zu einer Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausscheidung im Urin (17;59;93). Umgekehrt bewirkt eine metabolische Alkalose eine Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Resorption (73;93). Die Aktivität von TRPV5 ist pH-abhängig (49;102). Vennekens und Mitarbeiter konnten zeigen, daß es bei pH-Werten von 6,0, also einer extrazellulären Ansäuerung, zu einer signifikanten Hemmung von TRPV5 kommt. Weitere Erkenntnisse wurden kürzlich durch Lambers und Mitarbeiter publiziert. Sie zeigten, daß der extrazelluläre pH-Wert die Oberflächenexpression von TRPV5 reguliert (55). Durch eine extrazelluläre Alkalisierung wird eine große Anzahl an TRPV5 enthaltenden Vesikeln schnell an die Zelloberfläche rekrutiert. Die Oberflächenexpression des Kanals wird hierdurch signifikant erhöht. Eine extrazelluläre Ansäuerung hingegen bewirkt einen Rückzug der Vesikel von der Plasmamembran und eine nachfolgend verminderte TRPV5-Aktivität (55). Darüber hinaus wurde untersucht, wie sich eine extrazelluläre Alkalisierung auf die funktionelle Erholung der TRPV5-Aktivität nach Inaktivierung mit MTSET verhält. MTSET (Methanethiosulfonat-Derivat) bewirkte durch eine irreversible Bindung an TRPV5 eine Inaktivierung der in der Plasmamembran vorhandenen Kanäle. Dabei zeigte sich, daß sich die TRPV5-Aktivität nach Alkalisierung schneller erholte (26). Zusammenfassend deutet dies darauf hin, daß pH-Änderungen die TRPV5-Aktivität über die Kontrolle des „trafficking“ des Kanals an die Zelloberfläche regulieren (94). Der molekulare Mechanismus dieser Regulation ist noch nicht bekannt. NHERF2 ist ein Protein, welches eine Rolle im „trafficking“ von Proteinen spielt. Sowohl TRPV5 als auch NHE3 werden durch NHERF2 reguliert. NHE3 ist der apikale epitheliale  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher, der sich im proximalen Tubulus, dem aufsteigenden Teil der Henle-Schleife und im Darm befindet (62;89). NHERF2 könnte demnach ein Bindeglied zwischen TRPV5-Aktivität und der Regulation des Säure-Basen-Haushaltes darstellen.

Die von uns durchgeführten Versuche gaben Einblick in die *in vitro*-Regulation von TRPV5. Eine weitere Studie unserer Arbeitsgruppe untersuchte die Rolle von SGK1 in der Regulation des renalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transports *in vivo* mit Hilfe von SGK1<sup>-/-</sup>-Mäusen (86). Dabei zeigte sich eine geringere TRPV5-Expression im

Sammelrohr und der Pars convoluta distalis in den SGK1<sup>-/-</sup>-Mäusen verglichen mit der Wildtyp-Kontrollgruppe. Eine Ca<sup>2+</sup>-Mangel-Diät führte allerdings zu einer Aufregulation der TRPV5-Plasmamembranabundanz in beiden Genotypen. Aufgrund der geringeren TRPV5-Expression der Zellmembranen der mutierten Mäuse wurde bei ihnen eine verminderte renale Ca<sup>2+</sup>-Resorption und eine Neigung zu Calciurie erwartet. Überraschenderweise zeigte sich aber, daß die renale Ca<sup>2+</sup>-Ausscheidung unter einer Kontrolldiät in den SGK1<sup>-/-</sup>-Mäusen verglichen mit der Wildtyp-Kontrollgruppe signifikant niedriger war. Der Mangel an SGK1 führt im Aldosteron-empfindlichen distalen Nephronabschnitt zu einer verminderten Na<sup>+</sup>-Resorption, was eine verstärkte Na<sup>+</sup>-Resorption im proximalen Nephron zur Folge hat (113). Die Ca<sup>2+</sup>-Resorption erfolgt im proximalen Abschnitt entlang eines elektrochemischen Gradienten, welcher durch die Resorption von Na<sup>+</sup> und Wasser erzeugt wird (48). Daraufhin postulierten die Autoren, daß die verminderte TRPV5-Abundanz der Zellmembranen der mutierten Mäuse durch eine erhöhte Ca<sup>2+</sup>-Resorption in den höher gelegenen Tubulusabschnitten kompensiert werden könnte (86).

Neben der Proteinkinase SGK1 aktiviert auch deren Isoform SGK3 in Anwesenheit von NHERF2 TRPV5 (30). Demnach könnte SGK3 in den SGK1<sup>-/-</sup>-Mäusen die Funktion von SGK1 kompensieren. Es wäre interessant, die Ergebnisse von Sandulache und Mitarbeitern (86) mit weiteren Versuchen an mutierten Mäusen zu vergleichen, bei denen neben SGK1 auch SGK3 fehlt.

Darüber hinaus könnte generell die Regulation von TRPV5 durch SGK3 genauer untersucht werden. Die Aminosäuresequenzen der katalytischen Domänen von SGK1 und SGK3 sind zu 80% identisch. Beide Kinasen kommen in fast allen humanen Geweben vor und besitzen die gleiche Konsensussequenz (54;56). Auch SGK3 benötigt zur Aktivierung von TRPV5 das Gerüstprotein NHERF2 (30). Es wäre deshalb interessant herauszufinden, ob sich die Regulation der beiden Kinasen bei weiterer Durchleuchtung gleich verhält oder Unterschiede aufweist.

#### **4.4 *Schlußfolgerung***

Unsere in Kapitel 1.7 gestellten Fragen konnten mit einer Ausnahme komplett beantwortet werden. Trotz unserer Ergebnisse bleiben dennoch viele Fragen über die Regulation von TRPV5 durch <sup>S422D</sup>SGK1 und NHERF2 offen. Weitere Untersuchungen sollten die Interaktionsvorgänge der beteiligten Proteine genauer charakterisieren und die Rolle der SGK1-Konsensussequenz auf TRPV5 weiter durchleuchten. Darüber hinaus wäre es interessant, weitere Erkenntnisse über die Rolle von NHERF2 in der PTH-Signalübertragung zu gewinnen und zu untersuchen, ob NHERF2 ein Bindeglied zwischen TRPV5-Aktivität und der Regulation des Säure-Basen-Haushaltes darstellt. Des Weiteren könnte auch die Regulation von TRPV5 durch SGK3 genauer beobachtet werden.

## 5 Zusammenfassung

Das  $\text{Ca}^{2+}$ -Gleichgewicht des Körpers wird durch das Zusammenspiel von intestinaler und renaler Feinregulation aufrechterhalten. Der epitheliale Calciumkanal TRPV5 spielt besonders bei der renalen Resorption von  $\text{Ca}^{2+}$  eine entscheidende Rolle.

In dieser Arbeit konnte durch elektrophysiologische und Lumineszenz-Messungen gezeigt werden, daß TRPV5 durch die Proteinkinase  $\text{S}^{422\text{D}}$ SGK1 in Anwesenheit des Gerüstproteins NHERF2 aufreguliert wird. Dieser stimulierende Effekt wird durch eine Erhöhung der Abundanz des Kanals in der Plasmamembran erzielt. Für die Aktivierung von TRPV5 ist die katalytische Domäne der Proteinkinase notwendig. Die Zerstörung der SGK1-Konsensussequenz auf TRPV5, die eine putative Phosphorylierungsstelle darstellt, hob die Aktivierung des Kanals durch  $\text{S}^{422\text{D}}$ SGK1 und NHERF2 auf. „Overlay“- und „Pull-down“- Experimente zeigten, daß der C-Terminus von TRPV5  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig mit NHERF2 interagiert. Darüber hinaus konnten wir durch elektrophysiologische und Lumineszenz-Messungen demonstrieren, daß die zweite PDZ-Domäne auf NHERF2 für die Aktivierung von TRPV5 durch  $\text{S}^{422\text{D}}$ SGK1 notwendig ist.

Durch unsere Untersuchungen konnten somit wichtige Erkenntnisse bezüglich der renalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation gewonnen werden.

Weiterführende Untersuchungen zur Interaktion von TRPV5, NHERF2 und  $\text{S}^{422\text{D}}$ SGK1 bieten sich an.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Akutsu, N., Lin, R., Bastien, Y., Bestawros, A., Enepekides, D. J., Black, M. J., and White, J. H. Regulation of Gene Expression by 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 and Its Analog EB1089 Under Growth-Inhibitory Conditions in Squamous Carcinoma Cells. *Mol.Endocrinol.* 2001;15(7):1127-39.
2. Alberts, Johnson Lewis Raff Roberts Walter, *Molekularbiologie der Zelle.* 4 ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag; 2004.
3. BelAiba, R. S., Djordjevic, T., Bonello, S., Artunc, F., Lang, F., Hess, J., and Gorlach, A. The Serum- and Glucocorticoid-Inducible Kinase Sgk-1 Is Involved in Pulmonary Vascular Remodeling: Role in Redox-Sensitive Regulation of Tissue Factor by Thrombin. *Circ.Res.* 31-3-2006;98(6):828-36.
4. Bhargava, A., Fullerton, M. J., Myles, K., Purdy, T. M., Funder, J. W., Pearce, D., and Cole, T. J. The Serum- and Glucocorticoid-Induced Kinase Is a Physiological Mediator of Aldosterone Action. *Endocrinology* 2001;142(4):1587-94.
5. Bindels, R. J. Calcium Handling by the Mammalian Kidney. *J.Exp.Biol.* 1993;184:89-104.
6. Bindels, R. J., Hartog, A., Timmermans, J., and van Os, C. H. Active Ca<sup>2+</sup> Transport in Primary Cultures of Rabbit Kidney CCD: Stimulation by 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and PTH. *Am.J.Physiol* 1991;261(5 Pt 2):F799-F807.
7. Biondi, R. M., Cheung, P. C., Casamayor, A., Deak, M., Currie, R. A., and Alessi, D. R. Identification of a Pocket in the PDK1 Kinase Domain That Interacts With PIF and the C-Terminal Residues of PKA. *EMBO J.* 1-3-2000;19(5):979-88.
8. Biondi, R. M., Kieloch, A., Currie, R. A., Deak, M., and Alessi, D. R. The PIF-Binding Pocket in PDK1 Is Essential for Activation of S6K and SGK, but Not PKB. *EMBO J.* 15-8-2001;20(16):4380-90.
9. Boehmer, C., Henke, G., Schniepp, R., Palmada, M., Rothstein, J. D., Broer, S., and Lang, F. Regulation of the Glutamate Transporter EAAT1 by the Ubiquitin Ligase Nedd4-2 and the Serum and Glucocorticoid-Inducible Kinase Isoforms SGK1/3 and Protein Kinase B. *J.Neurochem.* 2003;86(5):1181-8.

10. Boehmer, C., Rajamanickam, J., Schniepp, R., Kohler, K., Wulff, P., Kuhl, D., Palmada, M., and Lang, F. Regulation of the Excitatory Amino Acid Transporter EAAT5 by the Serum and Glucocorticoid Dependent Kinases SGK1 and SGK3. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 8-4-2005;329(2):738-42.
11. Boehmer, C., Wilhelm, V., Palmada, M., Wallisch, S., Henke, G., Brinkmeier, H., Cohen, P., Pieske, B., and Lang, F. Serum and Glucocorticoid Inducible Kinases in the Regulation of the Cardiac Sodium Channel SCN5A. *Cardiovasc.Res.* 15-3-2003;57(4):1079-84.
12. Bohmer, C., Philippin, M., Rajamanickam, J., Mack, A., Broer, S., Palmada, M., and Lang, F. Stimulation of the EAAT4 Glutamate Transporter by SGK Protein Kinase Isoforms and PKB. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 26-11-2004;324(4):1242-8.
13. Brennan, F. E. and Fuller, P. J. Rapid Upregulation of Serum and Glucocorticoid-Regulated Kinase (Sgk) Gene Expression by Corticosteroids in Vivo. *Mol.Cell Endocrinol.* 30-8-2000;166(2):129-36.
14. Brown, A. J., Dusso, A., and Slatopolsky, E. Vitamin D. *Am.J.Physiol* 1999;277(2 Pt 2):F157-F175.
15. Brown, E. M., Gamba, G., Riccardi, D., Lombardi, M., Butters, R., Kifor, O., Sun, A., Hediger, M. A., Lytton, J., and Hebert, S. C. Cloning and Characterization of an Extracellular Ca(2+)-Sensing Receptor From Bovine Parathyroid. *Nature* 9-12-1993;366(6455):575-80.
16. Brunet, A., Park, J., Tran, H., Hu, L. S., Hemmings, B. A., and Greenberg, M. E. Protein Kinase SGK Mediates Survival Signals by Phosphorylating the Forkhead Transcription Factor FKHL1 (FOXO3a). *Mol.Cell Biol.* 2001;21(3):952-65.
17. Canzanello, V. J., Bodvarsson, M., Kraut, J. A., Johns, C. A., Slatopolsky, E., and Madias, N. E. Effect of Chronic Respiratory Acidosis on Urinary Calcium Excretion in the Dog. *Kidney Int.* 1990;38(3):409-16.
18. Cao, T. T., Deacon, H. W., Reczek, D., Bretscher, A., and von Zastrow, M. A Kinase-Regulated PDZ-Domain Interaction Controls Endocytic Sorting of the Beta2-Adrenergic Receptor. *Nature* 16-9-1999;401(6750):286-90.
19. Chen, S. Y., Bhargava, A., Mastroberardino, L., Meijer, O. C., Wang, J., Buse, P., Firestone, G. L., Verrey, F., and Pearce, D. Epithelial Sodium Channel Regulated by Aldosterone-Induced Protein Sgk. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2-3-1999;96(5):2514-9.

20. Chu, S., Rushdi, S., Zumpe, E. T., Mamers, P., Healy, D. L., Jobling, T., Burger, H. G., and Fuller, P. J. FSH-Regulated Gene Expression Profiles in Ovarian Tumours and Normal Ovaries. *Mol.Hum.Reprod.* 2002;8(5):426-33.
21. Chun, J., Kwon, T., Lee, E., Suh, P. G., Choi, E. J., and Sun, Kang S. The Na(+)/H(+) Exchanger Regulatory Factor 2 Mediates Phosphorylation of Serum- and Glucocorticoid-Induced Protein Kinase 1 by 3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase 1. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 25-10-2002;298(2):207-15.
22. Clapham, D. E., Julius, D., Montell, C., and Schultz, G. International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Transient Receptor Potential Channels. *Pharmacol.Rev.* 2005;57(4):427-50.
23. Cowling, R. T. and Birnboim, H. C. 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):240-8.
24. Dascal, N. The Use of *Xenopus* Oocytes for the Study of Ion Channels. *CRC Crit Rev.Biochem.* 1987;22(4):317-87.
25. Delmolino, L. M. and Castellot, J. J., Jr. Heparin Suppresses Sgk, an Early Response Gene in Proliferating Vascular Smooth Muscle Cells. *J.Cell Physiol* 1997;173(3):371-9.
26. Dodier, Y., Banderali, U., Klein, H., Topalak, O., Dafi, O., Simoes, M., Bernatchez, G., Sauve, R., and Parent, L. Outer Pore Topology of the ECaC-TRPV5 Channel by Cysteine Scan Mutagenesis. *J.Biol.Chem.* 20-2-2004;279(8):6853-62.
27. Dumont, J. N. Oogenesis in *Xenopus Laevis* (Daudin). I. Stages of Oocyte Development in Laboratory Maintained Animals. *J.Morphol.* 1972;136(2):153-79.
28. Embark, H. M., Bohmer, C., Palmada, M., Rajamanickam, J., Wyatt, A. W., Wallisch, S., Capasso, G., Waldegger, P., Seyberth, H. W., Waldegger, S., and Lang, F. Regulation of CLC-Ka/Barttin by the Ubiquitin Ligase Nedd4-2 and the Serum- and Glucocorticoid-Dependent Kinases. *Kidney Int.* 2004;66(5):1918-25.
29. Embark, H. M., Bohmer, C., Vallon, V., Luft, F., and Lang, F. Regulation of KCNE1-Dependent K(+) Current by the Serum and Glucocorticoid-Inducible Kinase (SGK) Isoforms. *Pflugers Arch.* 2003;445(5):601-6.

30. Embark, H. M., Setiawan, I., Poppendieck, S., van de Graaf, S. F., Boehmer, C., Palmada, M., Wieder, T., Gerstberger, R., Cohen, P., Yun, C. C., Bindels, R. J., and Lang, F. Regulation of the Epithelial Ca<sup>2+</sup> Channel TRPV5 by the NHE Regulating Factor NHERF2 and the Serum and Glucocorticoid Inducible Kinase Isoforms SGK1 and SGK3 Expressed in *Xenopus* Oocytes. *Cell Physiol Biochem.* 2004;14(4-6):203-12.
31. Fanning, A. S. and Anderson, J. M. PDZ Domains: Fundamental Building Blocks in the Organization of Protein Complexes at the Plasma Membrane. *J.Clin.Invest* 1999;103(6):767-72.
32. Friedman, P. A., Coutermarsh, B. A., Kennedy, S. M., and Gesek, F. A. Parathyroid Hormone Stimulation of Calcium Transport Is Mediated by Dual Signaling Mechanisms Involving Protein Kinase A and Protein Kinase C. *Endocrinology* 1996;137(1):13-20.
33. Friedman, P. A. and Gesek, F. A. Vitamin D3 Accelerates PTH-Dependent Calcium Transport in Distal Convolute Tubule Cells. *Am.J.Physiol* 1993;265(2 Pt 2):F300-F308.
34. Friedman, P. A. and Gesek, F. A. Cellular Calcium Transport in Renal Epithelia: Measurement, Mechanisms, and Regulation. *Physiol Rev.* 1995;75(3):429-71.
35. Friedrich, B., Warntges, S., Klingel, K., Sauter, M., Kandolf, R., Risler, T., Muller, G. A., Witzgall, R., Kriz, W., Grone, H. J., and Lang, F. Up-Regulation of the Human Serum and Glucocorticoid-Dependent Kinase 1 in Glomerulonephritis. *Kidney Blood Press Res.* 2002;25(5):303-7.
36. Gesek, F. A. and Friedman, P. A. Calcitonin Stimulates Calcium Transport in Distal Convolute Tubule Cells. *Am.J.Physiol* 1993;264(4 Pt 2):F744-F751.
37. Gurdon, J. B., *Introductory comments: Xenopus as a laboratory animal* Clarendon Press; 1996.
38. Gurdon, J. B. and Hopwood, N. The Introduction of *Xenopus Laevis* into Developmental Biology: of Empire, Pregnancy Testing and Ribosomal Genes. *Int.J.Dev.Biol.* 2000;44(1):43-50.
39. Gurdon, J. B., Lane, C. D., Woodland, H. R., and Marbaix, G. Use of Frog Eggs and Oocytes for the Study of Messenger RNA and Its Translation in Living Cells. *Nature* 17-9-1971;233(5316):177-82.
40. Hall, R. A., Ostedgaard, L. S., Premont, R. T., Blitzer, J. T., Rahman, N., Welsh, M. J., and Lefkowitz, R. J. A C-Terminal Motif Found in the Beta2-Adrenergic Receptor, P2Y1 Receptor and Cystic Fibrosis

Transmembrane Conductance Regulator Determines Binding to the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger Regulatory Factor Family of PDZ Proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 21-7-1998;95(15):8496-501.

41. Hall, R. A., Premont, R. T., Chow, C. W., Blitzer, J. T., Pitcher, J. A., Claing, A., Stoffel, R. H., Barak, L. S., Shenolikar, S., Weinman, E. J., Grinstein, S., and Lefkowitz, R. J. The Beta2-Adrenergic Receptor Interacts With the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Exchanger Regulatory Factor to Control Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchange. *Nature* 9-4-1998;392(6676):626-30.
42. Harris, B. Z. and Lim, W. A. Mechanism and Role of PDZ Domains in Signaling Complex Assembly. *J.Cell Sci.* 2001;114(Pt 18):3219-31.
43. Herold, G., *Innere Medizin. Köln: 2004.*(Herold, G.
44. Hoenderop, J. G., Dardenne, O., Van Abel, M., van der Kemp, A. W., van Os, C. H., Arnaud, R., and Bindels, R. J. Modulation of Renal Ca<sup>2+</sup> Transport Protein Genes by Dietary Ca<sup>2+</sup> and 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-1alpha-Hydroxylase Knockout Mice. *FASEB J.* 2002;16(11):1398-406.
45. Hoenderop, J. G., Hartog, A., Stuiver, M., Doucet, A., Willems, P. H., and Bindels, R. J. Localization of the Epithelial Ca(2+) Channel in Rabbit Kidney and Intestine. *J.Am.Soc.Nephrol.* 2000;11(7):1171-8.
46. Hoenderop, J. G., Muller, D., van der Kemp, A. W., Hartog, A., Suzuki, M., Ishibashi, K., Imai, M., Sweep, F., Willems, P. H., van Os, C. H., and Bindels, R. J. Calcitriol Controls the Epithelial Calcium Channel in Kidney. *J.Am.Soc.Nephrol.* 2001;12(7):1342-9.
47. Hoenderop, J. G., Nilius, B., and Bindels, R. J. ECaC: the Gatekeeper of Transepithelial Ca<sup>2+</sup> Transport. *Biochim.Biophys.Acta* 4-11-2002;1600(1-2):6-11.
48. Hoenderop, J. G., Nilius, B., and Bindels, R. J. Molecular Mechanism of Active Ca<sup>2+</sup> Reabsorption in the Distal Nephron. *Annu.Rev.Physiol* 2002;64:529-49.
49. Hoenderop, J. G., van der Kemp, A. W., Hartog, A., van de Graaf, S. F., van Os, C. H., Willems, P. H., and Bindels, R. J. Molecular Identification of the Apical Ca<sup>2+</sup> Channel in 1, 25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-Responsive Epithelia. *J.Biol.Chem.* 26-3-1999;274(13):8375-8.
50. Hoenderop, J. G., van Leeuwen, J. P., van der Eerden, B. C., Kersten, F. F., van der Kemp, A. W., Merillat, A. M., Waarsing, J. H., Rossier, B. C., Vallon, V., Hummler, E., and Bindels, R. J. Renal Ca<sup>2+</sup>

Wasting, Hyperabsorption, and Reduced Bone Thickness in Mice Lacking TRPV5. *J.Clin.Invest* 2003;112(12):1906-14.

51. Hoenderop, J. G., Vennekens, R., Muller, D., Prenen, J., Droogmans, G., Bindels, R. J., and Nilius, B. Function and Expression of the Epithelial Ca(2+) Channel Family: Comparison of Mammalian ECaC1 and 2. *J.Physiol* 15-12-2001;537(Pt 3):747-61.
52. Klingel, K., Warntges, S., Bock, J., Wagner, C. A., Sauter, M., Waldegger, S., Kandolf, R., and Lang, F. Expression of Cell Volume-Regulated Kinase H-Sgk in Pancreatic Tissue. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 2000;279(5):G998-G1002.
53. Kobayashi, T. and 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.* 15-4-1999;339 ( Pt 2):319-28.
54. Kobayashi, T., Deak, M., Morrice, N., and Cohen, P. Characterization of the Structure and Regulation of Two Novel Isoforms of Serum- and Glucocorticoid-Induced Protein Kinase. *Biochem.J.* 15-11-1999;344 Pt 1:189-97.
55. Lambers, T. T., Oancea, E., de Groot, T., Topala, C. N., Hoenderop, J. G., and Bindels, R. J. Extracellular PH Dynamically Controls Cell Surface Delivery of Functional TRPV5 Channels. *Mol.Cell Biol.* 2007;27(4):1486-94.
56. Lang, F., Bohmer, C., Palmada, M., Seebohm, G., Strutz-Seebohm, N., and Vallon, V. (Patho)Physiological Significance of the Serum- and Glucocorticoid-Inducible Kinase Isoforms. *Physiol Rev.* 2006;86(4):1151-78.
57. Lang, F. and Cohen, P. Regulation and Physiological Roles of Serum- and Glucocorticoid-Induced Protein Kinase Isoforms. *Sci.STKE.* 13-11-2001;2001(108):RE17.
58. Lang, F., Klingel, K., Wagner, C. A., Stegen, C., Warntges, S., Friedrich, B., Lanzendorfer, M., Melzig, J., Moschen, I., Steuer, S., Waldegger, S., Sauter, M., Paulmichl, M., Gerke, V., Risler, T., Gamba, G., Capasso, G., Kandolf, R., Hebert, S. C., Massry, S. G., and Broer, S. Deranged Transcriptional Regulation of Cell-Volume-Sensitive Kinase HSGK in Diabetic Nephropathy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 5-7-2000;97(14):8157-62.
59. Lemann, J., Jr., Bushinsky, D. A., and Hamm, L. L. Bone Buffering of Acid and Base in Humans. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 2003;285(5):F811-F832.

60. Leong, M. L., Maiyar, A. C., Kim, B., O'Keeffe, B. A., and Firestone, G. L. 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.* 21-2-2003;278(8):5871-82.
61. Loffing, J., Zecevic, M., Feraille, E., Kaissling, B., Asher, C., Rossier, B. C., Firestone, G. L., Pearce, D., and Verrey, F. 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.
62. Lorenz, J. N., Schultheis, P. J., Traynor, T., Shull, G. E., and Schnermann, J. Micropuncture Analysis of Single-Nephron Function in NHE3-Deficient Mice. *Am.J.Physiol* 1999;277(3 Pt 2):F447-F453.
63. Mahon, M. J., Donowitz, M., Yun, C. C., and Segre, G. V. Na(+)/H(+) Exchanger Regulatory Factor 2 Directs Parathyroid Hormone 1 Receptor Signalling. *Nature* 20-6-2002;417(6891):858-61.
64. Meng, F., Yamagiwa, Y., Taffetani, S., Han, J., and Patel, T. IL-6 Activates Serum and Glucocorticoid Kinase Via P38alpha Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 2005;289(4):C971-C981.
65. Mensenkamp, A. R., Hoenderop, J. G., and Bindels, R. J. TRPV5, the Gateway to Ca<sup>2+</sup> Homeostasis. *Handb.Exp.Pharmacol.* 2007;(179):207-20.
66. Mizuno, H. and Nishida, E. The ERK MAP Kinase Pathway Mediates Induction of SGK (Serum- and Glucocorticoid-Inducible Kinase) by Growth Factors. *Genes Cells* 2001;6(3):261-8.
67. Montell, C., Birnbaumer, L., and Flockerzi, V. The TRP Channels, a Remarkably Functional Family. *Cell* 8-3-2002;108(5):595-8.
68. Muller, D., Hoenderop, J. G., Meij, I. C., van den Heuvel, L. P., Knoers, N. V., den Hollander, A. I., Eggert, P., Garcia-Nieto, V., Claverie-Martin, F., and Bindels, R. J. Molecular Cloning, Tissue Distribution, and Chromosomal Mapping of the Human Epithelial Ca<sup>2+</sup> Channel (ECAC1). *Genomics* 1-7-2000;67(1):48-53.
69. Muller, D., Hoenderop, J. G., Merckx, G. F., van Os, C. H., and Bindels, R. J. Gene Structure and Chromosomal Mapping of Human Epithelial Calcium Channel. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 18-8-2000;275(1):47-52.

70. Muller, D., Hoenderop, J. G., Vennekens, R., Eggert, P., Harangi, F., Mehes, K., Garcia-Nieto, V., Claverie-Martin, F., Os, C. H., Nilius, B., and Bindels, J. M. Epithelial Ca<sup>2+</sup> Channel (ECAC1) in Autosomal Dominant Idiopathic Hypercalciuria. *Nephrol.Dial.Transplant.* 2002;17(9):1614-20.
71. Murthy, A., Gonzalez-Agosti, C., Cordero, E., Pinney, D., Candia, C., Solomon, F., Gusella, J., and Ramesh, V. NHE-RF, a Regulatory Cofactor for Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> Exchange, Is a Common Interactor for Merlin and ERM (MERM) Proteins. *J.Biol.Chem.* 16-1-1998;273(3):1273-6.
72. Nijenhuis, T., Hoenderop, J. G., Nilius, B., and Bindels, R. J. (Patho)Physiological Implications of the Novel Epithelial Ca<sup>2+</sup> Channels TRPV5 and TRPV6. *Pflugers Arch.* 2003;446(4):401-9.
73. Nijenhuis, T., Renkema, K. Y., Hoenderop, J. G., and Bindels, R. J. Acid-Base Status Determines the Renal Expression of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> Transport Proteins. *J.Am.Soc.Nephrol.* 2006;17(3):617-26.
74. Nilius, B., Prenen, J., Hoenderop, J. G., Vennekens, R., Hoefs, S., Weidema, A. F., Droogmans, G., and Bindels, R. J. Fast and Slow Inactivation Kinetics of the Ca<sup>2+</sup> Channels ECaC1 and ECaC2 (TRPV5 and TRPV6). Role of the Intracellular Loop Located Between Transmembrane Segments 2 and 3. *J.Biol.Chem.* 23-8-2002;277(34):30852-8.
75. Nilius, B., Prenen, J., Vennekens, R., Hoenderop, J. G., Bindels, R. J., and Droogmans, G. Modulation of the Epithelial Calcium Channel, ECaC, by Intracellular Ca<sup>2+</sup>. *Cell Calcium* 2001;29(6):417-28.
76. Palmada, M., Dieter, M., Boehmer, C., Waldegger, S., and Lang, F. Serum and Glucocorticoid Inducible Kinases Functionally Regulate CIC-2 Channels. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 3-9-2004;321(4):1001-6.
77. Palmada, M., Embark, H. M., Wyatt, A. W., Bohmer, C., and Lang, F. Negative Charge at the Consensus Sequence for the Serum- and Glucocorticoid-Inducible Kinase, SGK1, Determines PH Sensitivity of the Renal Outer Medullary K<sup>+</sup> Channel, ROMK1. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 8-8-2003;307(4):967-72.
78. Palmada, M., Embark, H. M., Yun, C., Bohmer, C., and Lang, F. Molecular Requirements for the Regulation of the Renal Outer Medullary K<sup>+</sup> Channel ROMK1 by the Serum- and Glucocorticoid-Inducible Kinase SGK1. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 21-11-2003;311(3):629-34.

79. Park, J., Leong, M. L., Buse, P., Maiyar, A. C., Firestone, G. L., and Hemmings, B. A. Serum and Glucocorticoid-Inducible Kinase (SGK) Is a Target of the PI 3-Kinase-Stimulated Signaling Pathway. *EMBO J.* 1-6-1999;18(11):3024-33.
80. Peng, J. B., Brown, E. M., and Hediger, M. A. Apical Entry Channels in Calcium-Transporting Epithelia. *News Physiol Sci.* 2003;18:158-63.
81. Peng, J. B., Zhuang, L., Berger, U. V., Adam, R. M., Williams, B. J., Brown, E. M., Hediger, M. A., and Freeman, M. R. CaT1 Expression Correlates With Tumor Grade in Prostate Cancer. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 6-4-2001;282(3):729-34.
82. Pollak, M. R., Brown, E. M., Chou, Y. H., Hebert, S. C., Marx, S. J., Steinmann, B., Levi, T., Seidman, C. E., and Seidman, J. G. Mutations in the Human Ca(2+)-Sensing Receptor Gene Cause Familial Hypocalciuric Hypercalcemia and Neonatal Severe Hyperparathyroidism. *Cell* 31-12-1993;75(7):1297-303.
83. Pollak, M. R., Brown, E. M., Estep, H. L., McLaine, P. N., Kifor, O., Park, J., Hebert, S. C., Seidman, C. E., and Seidman, J. G. Autosomal Dominant Hypocalcaemia Caused by a Ca(2+)-Sensing Receptor Gene Mutation. *Nat.Genet.* 1994;8(3):303-7.
84. Renkema, K. Y., Nijenhuis, T., van der Eerden, B. C., van der Kemp, A. W., Weinans, H., van Leeuwen, J. P., Bindels, R. J., and Hoenderop, J. G. Hypervitaminosis D Mediates Compensatory Ca<sup>2+</sup> Hyperabsorption in TRPV5 Knockout Mice. *J.Am.Soc.Nephrol.* 2005;16(11):3188-95.
85. Rozansky, D. J., Wang, J., Doan, N., Purdy, T., Faulk, T., Bhargava, A., Dawson, K., and Pearce, D. Hypotonic Induction of SGK1 and Na<sup>+</sup> Transport in A6 Cells. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 2002;283(1):F105-F113.
86. Sandulache, D., Grahammer, F., Artunc, F., Henke, G., Hussain, A., Nasir, O., Mack, A., Friedrich, B., Vallon, V., Wulff, P., Kuhl, D., Palmada, M., and Lang, F. Renal Ca<sup>2+</sup> Handling in Sgk1 Knockout Mice. *Pflugers Arch.* 2006;452(4):444-52.
87. Schmidt, R. F, Thews, G., and Lang, F., *Physiologie des Menschen.* 28. Auflage ed.2000.(Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
88. Schniepp, R., Kohler, K., Ladewig, T., Guenther, E., Henke, G., Palmada, M., Boehmer, C., Rothstein, J. D., Broer, S., and Lang, F. Retinal Colocalization and in Vitro Interaction of the Glutamate Transporter EAAT3 and the Serum- and Glucocorticoid-Inducible

Kinase SGK1 [Correction]. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 2004;45(5):1442-9.

89. Schultheis, P. J., Clarke, L. L., Meneton, P., Miller, M. L., Soleimani, M., Gawenis, L. R., Riddle, T. M., Duffy, J. J., Doetschman, T., Wang, T., Giebisch, G., Aronson, P. S., Lorenz, J. N., and Shull, G. E. Renal and Intestinal Absorptive Defects in Mice Lacking the NHE3 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger. *Nat.Genet.* 1998;19(3):282-5.
90. Shelly, C. and Herrera, R. Activation of SGK1 by HGF, Rac1 and Integrin-Mediated Cell Adhesion in MDCK Cells: PI-3K-Dependent and -Independent Pathways. *J.Cell Sci.* 1-5-2002;115(Pt 9):1985-93.
91. Shenolikar, S., Voltz, J. W., Cunningham, R., and Weinman, E. J. Regulation of Ion Transport by the NHERF Family of PDZ Proteins. *Physiology.(Bethesda.)* 2004;19:362-9.
92. Strutz-Seebohm, N., Seebohm, G., Shumilina, E., Mack, A. F., Wagner, H. J., Lampert, A., Grahammer, F., Henke, G., Just, L., Skutella, T., Hollmann, M., and Lang, F. Glucocorticoid Adrenal Steroids and Glucocorticoid-Inducible Kinase Isoforms in the Regulation of GluR6 Expression. *J.Physiol* 1-6-2005;565(Pt 2):391-401.
93. Sutton, R. A., Wong, N. L., and Dirks, J. H. Effects of Metabolic Acidosis and Alkalosis on Sodium and Calcium Transport in the Dog Kidney. *Kidney Int.* 1979;15(5):520-33.
94. Topala, C. N., Bindels, R. J., and Hoenderop, J. G. Regulation of the Epithelial Calcium Channel TRPV5 by Extracellular Factors. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* 2007;16(4):319-24.
95. Ullrich, S., Berchtold, S., Ranta, F., Seebohm, G., Henke, G., Lupescu, A., Mack, A. F., Chao, C. M., Su, J., Nitschke, R., Alexander, D., Friedrich, B., Wulff, P., Kuhl, D., and Lang, F. Serum- and Glucocorticoid-Inducible Kinase 1 (SGK1) Mediates Glucocorticoid-Induced Inhibition of Insulin Secretion. *Diabetes* 2005;54(4):1090-9.
96. Van Abel, M., Hoenderop, J. G., Dardenne, O., St Arnaud, R., van Os, C. H., Van Leeuwen, H. J., and Bindels, R. J. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3)-Independent Stimulatory Effect of Estrogen on the Expression of ECaC1 in the Kidney. *J.Am.Soc.Nephrol.* 2002;13(8):2102-9.
97. Van Abel, M., Hoenderop, J. G., van der Kemp, A. W., Friedlaender, M. M., van Leeuwen, J. P., and Bindels, R. J. Coordinated Control of Renal Ca(2+) Transport Proteins by Parathyroid Hormone. *Kidney Int.* 2005;68(4):1708-21.

98. Van Cromphaut, S. J., Dewerchin, M., Hoenderop, J. G., Stockmans, I., Van Herck, E., Kato, S., Bindels, R. J., Collen, D., Carmeliet, P., Bouillon, R., and Carmeliet, G. Duodenal Calcium Absorption in Vitamin D Receptor-Knockout Mice: Functional and Molecular Aspects. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 6-11-2001;98(23):13324-9.
99. van de Graaf, S. F., Boullart, I., Hoenderop, J. G., and Bindels, R. J. Regulation of the Epithelial Ca<sup>2+</sup> Channels TRPV5 and TRPV6 by 1alpha,25-Dihydroxy Vitamin D3 and Dietary Ca<sup>2+</sup>. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 2004;89-90(1-5):303-8.
100. van de Graaf, S. F., Hoenderop, J. G., and Bindels, R. J. Regulation of TRPV5 and TRPV6 by Associated Proteins. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 2006;290(6):F1295-F1302.
101. Vennekens, R., Hoenderop, J. G., Prenen, J., Stuiver, M., Willems, P. H., Droogmans, G., Nilius, B., and Bindels, R. J. Permeation and Gating Properties of the Novel Epithelial Ca(2+) Channel. *J.Biol.Chem.* 11-2-2000;275(6):3963-9.
102. Vennekens, R., Prenen, J., Hoenderop, J. G., Bindels, R. J., Droogmans, G., and Nilius, B. Modulation of the Epithelial Ca<sup>2+</sup> Channel ECaC by Extracellular PH. *Pflugers Arch.* 2001;442(2):237-42.
103. von Filek, W., Frösche im Aquarium. 5.Aufl. ed. Stuttgart: Franckh'sche Verlagshandlung, W.Keller & Co.; 1985.
104. Wade, J. B., Welling, P. A., Donowitz, M., Shenolikar, S., and Weinman, E. J. Differential Renal Distribution of NHERF Isoforms and Their Colocalization With NHE3, Ezrin, and ROMK. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 2001;280(1):C192-C198.
105. Waldegger, S., Barth, P., Forrest, J. N., Jr., Greger, R., and 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):575-80.
106. Waldegger, S., Barth, P., Raber, G., and 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* 29-4-1997;94(9):4440-5.
107. Waldegger, S., Erdel, M., Nagl, U. O., Barth, P., Raber, G., Steuer, S., Utermann, G., Paulmichl, M., and Lang, F. Genomic Organization and Chromosomal Localization of the Human SGK Protein Kinase Gene. *Genomics* 15-7-1998;51(2):299-302.

108. Waldegger, S., Klingel, K., Barth, P., Sauter, M., Rfer, M. L., Kandolf, R., and Lang, F. H-Sgk Serine-Threonine Protein Kinase Gene As Transcriptional Target of Transforming Growth Factor Beta in Human Intestine. *Gastroenterology* 1999;116(5):1081-8.
109. Wasserman, R. H. and Fullmer, C. S. Vitamin D and Intestinal Calcium Transport: Facts, Speculations and Hypotheses. *J.Nutr.* 1995;125(7 Suppl):1971S-9S.
110. Webster, M. K., Goya, L., and Firestone, G. L. Immediate-Early Transcriptional Regulation and Rapid mRNA Turnover of a Putative Serine/Threonine Protein Kinase. *J.Biol.Chem.* 5-6-1993;268(16):11482-5.
111. Webster, M. K., Goya, L., Ge, Y., Maiyar, A. C., and Firestone, G. L. 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):2031-40.
112. Wolf, S. C., Schultze, M., Risler, T., Rieg, T., Lang, F., Schulze-Osthoff, K., and Brehm, B. R. Stimulation of Serum- and Glucocorticoid-Regulated Kinase-1 Gene Expression by Endothelin-1. *Biochem.Pharmacol.* 14-4-2006;71(8):1175-83.
113. Wulff, P., Vallon, V., Huang, D. Y., Volkl, H., Yu, F., Richter, K., Jansen, M., Schlunz, M., Klingel, K., Loffing, J., Kauselmann, G., Bosl, M. R., Lang, F., and Kuhl, D. Impaired Renal Na(+) Retention in the Sgk1-Knockout Mouse. *J.Clin.Invest* 2002;110(9):1263-8.
114. Yun, C. C., Chen, Y., and Lang, F. Glucocorticoid Activation of Na(+)/H(+) Exchanger Isoform 3 Revisited. The Roles of SGK1 and NHERF2. *J.Biol.Chem.* 8-3-2002;277(10):7676-83.
115. Yun, C. C., Palmada, M., Embark, H. M., Fedorenko, O., Feng, Y., Henke, G., Setiawan, I., Boehmer, C., Weinman, E. J., Sandrasagra, S., Korbmacher, C., Cohen, P., Pearce, D., and 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):2823-30.
116. Yun, C. H., Lamprecht, G., Forster, D. V., and 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.* 2-10-1998;273(40):25856-63.
117. Yun, C. H., Oh, S., Zizak, M., Steplock, D., Tsao, S., Tse, C. M., Weinman, E. J., and Donowitz, M. CAMP-Mediated Inhibition of the Epithelial Brush Border Na+/H+ Exchanger, NHE3, Requires

an Associated Regulatory Protein. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1-4-1997;94(7):3010-5.

118. Zhang, L., Cui, R., Cheng, X., and Du, J. Antiapoptotic Effect of Serum and Glucocorticoid-Inducible Protein Kinase Is Mediated by Novel Mechanism Activating I{Kappa}B Kinase. Cancer Res. 15-1-2005;65(2):457-64.

## 7 Danksagung

Hiermit möchte Ich mich bei allen bedanken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Zunächst danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Florian Lang für die Überlassung des Themas, seine Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Betreuerin Prof. Dr. rer. nat. Monica Palmada bedanken, welche mich von Anfang an in allen Angelegenheiten unterstützt hat, mich mit ihrer hohen Kompetenz in das wissenschaftliche Arbeiten einführte, mir stets und unermüdlich für Fragen oder Hilfestellungen zur Verfügung stand; hervorheben möchte ich besonders ihre außerordentliche Geduld und Freundlichkeit.

Einen ganz herzlichen Dank sagen möchte ich auch Dr. rer. nat. Christoph Böhmer für die sehr gute Einführung in die elektrophysiologische Arbeit im Oozytenlabor und für seine stetige Hilfsbereitschaft und sein Verständnis.

Ein Teil meiner Ergebnisse ist durch Kooperation mit einer internationalen Forschungsgruppe (Department of Physiology, Nijmegen Centre for Molecular Life Sciences, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen, Niederlande ) entstanden. Ich möchte mich hierbei besonders bei Stan F.J. van de Graaf für die Zusammenarbeit bedanken.

Des Weiteren danke ich allen Mitarbeitern des Physiologischen Instituts der Universität Tübingen für die stete Unterstützung und die angenehme und freundliche Atmosphäre.

Schließlich danke ich ganz besonders meinen Eltern, meiner restlichen Familie und meinen Freunden für die Unterstützung und Hilfestellung.

## 8 Lebenslauf

- geboren am 18.5.1981 in Stuttgart
- 1987 – 88: Höltysschule (Grundschule) Göttingen
- 1989 – 91: Ludwig-Uhland-Schule (Grundschule) Leinfelden-Echterdingen
- 1991 – 2000 (Abitur): Immanuel-Kant-Gymnasium Leinfelden-Echterdingen
- Oktober 2000: Beginn des Humanmedizinstudiums an der Universität Tübingen
- August 2002: Physikum
- August 2003: 1. Staatsexamen
- Sommersemester 2005: Erasmusaufenthalt an der Universität Bordeaux, Frankreich
- März 2006: 2. Staatsexamen
- 2006 – 2007: PJ in Stuttgart (Bürgerhospital (Innere Medizin und Neurologie)) und Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, Frankreich (Chirurgie)
- 1. Juni 2007: 3. Staatsexamen
- Oktober 2007: Beginn der Weiterbildung als Assistenzärztin in der Klinik für Neurologie im Klinikum Ludwigsburg