

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

**Die Serum- und Glukokortikoid-induzierbare
Kinase (SGK) in der Regulation intestinaler
Transporter und Ionenkanäle**

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

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

**vorgelegt von
Michael Dieter
aus
Tübingen**

2008

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lang

2. Berichterstatter: Professor Dr. C. Korbmacher

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Bedeutung des Natrium-Glukose-Kotransporters SGLT1	1
1.2	Bedeutung des anorganischen Phosphattransporters NaPi IIb	6
1.3	Bedeutung des Chloridkanals ClC-2.....	12
1.4	Bedeutung der Serum- und Glukokortikoid-induzierbaren Kinase 1 und ihrer verwandten Kinasen SGK2, SGK3 und PKB	21
1.5	Bedeutung der Ubiquitinligase Nedd4-2 sowie Interaktion von Nedd4-2 mit SGK.....	26
1.6	<i>Xenopus-laevis</i> -Oozyten als Expressionssystem	28
1.7	Fragestellung der Arbeit	30
2	Material und Methoden	31
2.1	Verwendete Lösungen und Substanzen	31
2.2	Oozytenpräparation	33
2.3	cRNA-Synthese und -Injektion.....	34
2.4	Elektrophysiologie: Zwei-Elektroden- <i>Voltage-Clamp</i> -Methode	36
2.5	Durchführung der Experimente.....	38
2.6	Auswertung und Statistik	39
3	Versuche und Ergebnisse	41
3.1	SGLT1	41
3.1.1	Inhibition von SGLT1 durch Nedd4-2.....	41
3.1.2	Stimulation von SGLT1 durch SGK1	42
3.1.3	Wirkung der Mutanten ^{C938S} Nedd4-2 und ^{S338AS444A} Nedd4-2 auf SGLT1	44
3.1.4	Wirkung der SGK-Mutanten ^{S422D} SGK1 und ^{K127N} SGK1 auf SGLT1	46
3.1.5	Wirkung der Kinasen SGK2, SGK3 sowie ^{T308DS473D} PKB auf SGLT1	48
3.1.6	Koexpression von SGK3 und PKB in SGLT1-exprimierenden Oozyten	50
3.2	NaPi IIb.....	51
3.2.1	Wirkung der SGK-Mutanten ^{S422D} SGK1 und ^{K127N} SGK1 sowie der Ubiquitinligase Nedd4-2 auf NaPi IIb.....	51
3.2.2	Wirkung der inaktiven Mutante ^{C938S} Nedd4-2 auf NaPi IIb.....	52

3.2.3	Untersuchungen zum Einfluss von ^{S422D} SGK1 und Nedd4-2 auf die Kinetik von NaPi IIb.....	53
3.2.4	Wirkung der Kinasen SGK2, SGK3 und ^{T308DS473D} PKB auf NaPi IIb .	55
3.3	CIC-2	56
3.3.1	Stimulation von CIC-2 durch SGK1, SGK2, SGK3 sowie ^{T308DS473D} PKB	56
3.3.2	Aktivität der CIC-2-Mutanten ^{S82A} CIC-2 und ^{S82D} CIC-2.....	58
3.3.3	Wirkung von Nedd4-2 und ^{C938S} Nedd4-2 auf CIC-2	60
3.3.4	Wirkung der SGK-Mutanten ^{S422D} SGK1 und ^{K127N} SGK1 auf CIC-2 ...	61
3.3.5	Wirkung der Kinasen SGK2, SGK3 und ^{T308DS473D} PKB auf CIC-2 bei Koexpression mit Nedd4-2.....	62
4	Diskussion	64
4.1	Fehlerdiskussion.....	64
4.1.1	Oozyten als Expressionssystem.....	64
4.1.2	Lösungen.....	66
4.1.3	Geräte.....	66
4.1.4	Auswertung und Statistik	67
4.2	Die Verwendung der <i>Voltage-Clamp</i> -Methode zur Untersuchung von SGLT1, NaPi IIb und CIC-2.....	67
4.3	SGLT1	68
4.4	NaPi IIb.....	71
4.5	CIC-2	73
5	Zusammenfassung.....	76
6	Literaturverzeichnis	80
7	Publikationsverzeichnis.....	116
8	Danksagung und Lebenslauf	117
8.1	Danksagung.....	117
8.2	Lebenslauf	118

1 Einleitung

1.1 Bedeutung des Natrium-Glukose-Kotransporters SGLT1

Glukose ist wesentlicher Energielieferant für die verschiedensten energieabhängigen Prozesse beim Menschen. Im Körper des Menschen sind etwa 450 g Glukose gespeichert, der tägliche Umsatz liegt bei ~250 g, allein das Gehirn verbraucht pro Tag ca. 125 g. Bei üblicher „westlicher“ Diät werden täglich etwa 180 g über die Nahrung (vorwiegend komplexe Kohlenhydrate, die im Darm zunächst gespalten werden) aufgenommen. Die Differenz zwischen über den Darm aufgenommener und benötigter Glukose wird bereitgestellt durch gespeicherte Glukose sowie insbesondere durch Glukoneogenese vorwiegend in der Leber und den Nieren. Die in den Glomeruli filtrierte etwa 180 g an Glukose werden fast vollständig im proximalen Tubulus rückresorbiert. Die Konzentration der Blutglukose wird innerhalb enger Grenzen (zwischen 4 und 12 mmol/l) gehalten, um zu gewährleisten, dass insbesondere für das Gehirn stets ausreichend Glukose zur Verfügung steht (329), und um andererseits toxische Effekte durch Glukose und eine Glukosurie zu vermeiden.

Für die Glukoseaufnahme im Dünndarm, die Glukosereabsorption in der Niere, den Glukosetransport über die Blut-Hirn-Schranke sowie Glukoseaufnahme und -abgabe in allen Körperzellen sind zwei Genfamilien von Glukosetransportern verantwortlich: einerseits die GLUT-Genfamilie (auch „SLC2“ genannt) (291) mittels erleichterten Glukosetransports und andererseits die SGLT-Genfamilie (auch als „SLC5“ bezeichnet) (328) mittels sekundär-aktiven Transports. GLUT1 ermöglicht den Glukosetransport über die Blut-Hirn-Schranke, GLUT4 die durch Insulin stimulierte Glukoseaufnahme in Skelettmuskelzellen und Adipozyten.

Im Dünndarm wird Glukose (ebenso wie Galaktose) über den in der Bürstensaummembran exprimierten Natrium-Glukose-Kotransporter SGLT1 mit Hilfe eines sekundär-aktiven Transports in die Enterozyten aufgenommen. Dieser Transport wird durch den aufgrund der Differenz zwischen intra- und

extrazellulärer Natriumkonzentration bestehenden elektrochemischen Gradienten angetrieben; die Natrium:Glukose-Stöchiometrie für SGLT1 beträgt 2:1. Das elektrochemische Potenzial über der Enterozytenmembran wird durch die in der basolateralen Membran lokalisierte Na^+/K^+ -ATPase aufrechterhalten, die für den kontinuierlichen Transport von Natriumionen aus der Zelle heraus im Austausch mit Kaliumionen verantwortlich ist. Mittels erleichterter Diffusion gelangt Glukose durch GLUT2 an der basolateralen Seite aus den Enterozyten in die Blutbahn (329). Ein kleinerer Anteil der intrazellulär vorliegenden Glukose wird vermutlich auch in Endosomen aufgenommen und über Exozytose ins Blut abgegeben (291).

In der Niere wird der Großteil der im Glomerulus filtrierte Glukose in der *Pars convoluta* des proximalen Tubulus durch SGLT2, einen Transporter mit niedriger Affinität und hoher Kapazität, rückresorbiert. Der restliche Anteil der Glukose wird durch SGLT1, einen Transporter mit hoher Affinität, reabsorbiert. Spezialisierte Neurone im Hypothalamus haben die Fähigkeit, Veränderungen in den sie umgebenden Glukosekonzentrationen zu messen und darauf zu reagieren. Mittels PCR wurden SGLT1, SGLT3a und SGLT3b in Ratten-Hypothalamusneuronen nachgewiesen. Möglicherweise spielen diese SGLT eine Rolle in der Glukosemessung von hypothalamischen, durch Glukose erregbaren Neuronen (213).

Bisher wurden 11 humane Transporter der SLC5-Genfamilie identifiziert (328). Dazu gehören die Glukosekotrporter SGLT1 (SLC5A1, transportiert auch Galaktose), SGLT2 (SLC5A2), SGLT4 (SLC5A9, transportiert auch Mannose) und SGLT6 (SLC5A11, transportiert auch Myoinositol), die Myoinositolkotrporter SMIT1 (SLC5A3, transportiert auch Glukose) und SMIT2 (entspricht SGLT6 bzw. SLC5A11), die Anionenkotrporter SLC5A5 und SLC5A8, der Vitaminkotrporter SLC5A6, der Cholinkotrporter SLC5A7, ein „Waise“ (SLC5A10) sowie der Glukosesensor SGLT3 (SLC5A4). Bei Vertebraten, Wirbellosen, Bakterien und Hefen wurden über 55 weitere Mitglieder der SGLT-Familie nachgewiesen (289, 327), zu denen z. B. die bakteriellen Galaktose-, Harnstoff- und Prolinkotrporter zählen.

SGLT3 stellt, wie oben bereits beschrieben ist, einen Glukosesensor dar, der in Neuronen des Hypothalamus, aber auch im Nervensystem des Darms sowie an der motorischen Endplatte lokalisiert ist (66). SGLT4 ist ein Mannose- und Glukosetransporter mit niedriger Affinität, der in einer großen Anzahl von Geweben einschließlich Pankreas nachgewiesen wurde (327). SGLT5 ist ein Transporter mit bislang unbekannter Funktion, er wird praktisch ausschließlich im renalen Kortex exprimiert. SGLT6 besitzt eine hohe Affinität zu Myoinositol ($K_m = 120 \mu\text{mol/l}$), aber nur eine geringe Affinität zu Glukose ($K_m = 35 \text{ mmol/l}$); seine Expressionsorte sind Gehirn, Niere und Darm (329).

Humaner SGLT1 ist auf Chromosom 22p lokalisiert (68, 113, 114, 287, 288) und wird beim Menschen überwiegend im Darm, aber auch in der Nierenrinde und im äußeren Nierenmark, in der Trachea, dem Herz, dem Gehirn, den Testes sowie in der Prostata exprimiert (214, 329). SGLT2 wird auf Chromosom 16p kodiert, er kommt vorwiegend in der Nierenrinde und mit geringeren Expressionsraten auch im Gehirn, in der Leber, der Schilddrüse, im Herz und im Muskel vor (317, 318, 329). Die SGLT1-, SGLT2- und SGLT3-Gene kodieren beim Menschen für Proteine mit 659 bis 672 Aminosäureresten (SGLT1 664 Reste). SGLT2 ist zu 59 % und SGLT3 zu 70 % mit SGLT1 identisch. Die Proteine der SLC5A-Genfamilie haben Molekulargewichte von $\sim 75 \text{ kDa}$ (329). SGLT2 und SGLT3 weisen wahrscheinlich dasselbe Sekundärstrukturprofil wie SGLT1 auf. SGLT1 umfasst 14 Transmembran- α -Helices (134, 151, 167, 289, Abb. 1). Sowohl der hydrophobe NH_2 -Terminus als auch der COOH -Terminus liegen extrazellulär. Alle SGLT besitzen eine putative Glykosylierungsstelle (Asn248) zwischen den Transmembranhelices 6 und 7. SGLT1 erfüllt seine Funktion mutmaßlich als Monomer (74, 342), wobei die 14 Transmembranhelices elliptisch in einem Verhältnis von 1,2:1 angeordnet sind (290). Die Transmembranhelices 4 und 5 kommen in enger Nachbarschaft zu den Transmembranhelices 10 und 11 zu liegen. Die Helices 10 bis 13 formen den Translokationspfad für Glukose durch SGLT1 (329). Bei 9 verschiedenen SGLT konnten 31 geladene sowie aromatische Reste innerhalb der Transmembranhelices 10 bis 14 nachgewiesen werden, die vermutlich zwei

Glukosebindungsstellen bilden (24, 70), wovon eine extrazellulär, die andere intrazellulär zu liegen kommt.

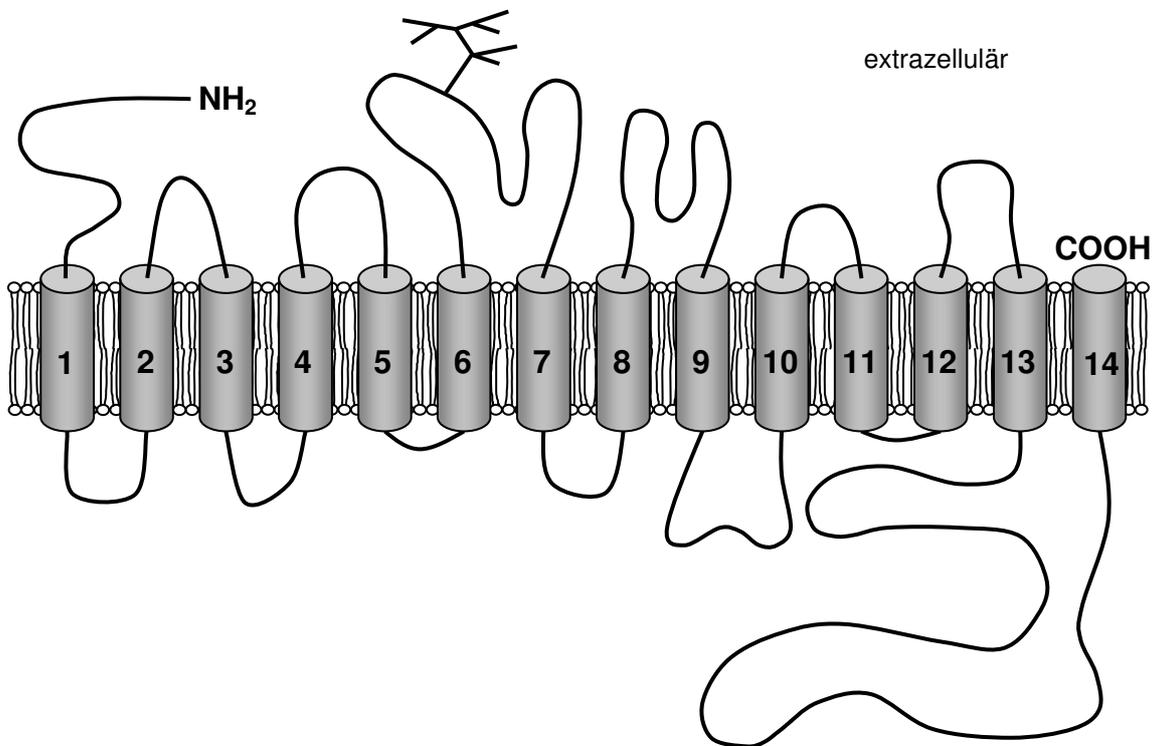


Abb. 1: Struktur des Natrium-Glukose-Kotransporters SGLT1 (modifiziert nach 327).

Glukosetransport ist in beide Richtungen möglich, die Transportrichtung ist lediglich abhängig vom elektrochemischen Natriumgradienten (75, 236). Allerdings ist die Glukose-Affinität für die intrazellulär gelegene Bindungsstelle deutlich niedriger und Phloridzin, ein spezifischer kompetitiver SGLT-Inhibitor, ist von der extrazellulären Seite her wesentlich wirkungsvoller (327).

SGLT1 und SGLT2 zeigen bei den verschiedenen bisher näher untersuchten Spezies (Mensch, Kaninchen, Ratte) sehr ähnliche Kinetikparameter (120, 137, 337). Für D-Glukose liegt der K_m -Wert von SGLT1 bei 0,5 mmol/l, von SGLT2 bei 2 mmol/l und von SGLT3 bei 6 mmol/l. SGLT1, SGLT2 und SGLT3 können auch α -Methyl-D-Glukose transportieren (K_m -Wert für SGLT1 0,4 mmol/l, für SGLT2 und SGLT3 2 mmol/l). SGLT1 besitzt verglichen mit SGLT2 und SGLT3 eine deutlich höhere Affinität zu Galaktose (K_m -Wert für SGLT1 0,5 mmol/l, für

SGLT2 und SGLT3 20 mmol/l). 3-O-Methyl-D-Glukose wird nur von SGLT1 transportiert. SGLT1 ist nicht in der Lage, Fruktose zu transportieren. Phloridzin stellt einen wirkungsvollen kompetitiven Inhibitor aller drei SGLT dar (120). Die Natrium- K_m -Werte für SGLT1 und SGLT3 sind spannungsabhängig, aber bei hyperpolarisierenden Membranpotenzialen von ca. -150 mV nähert sich der K_m -Wert asymptotisch ~ 3 mmol/l an (120, 179, 180). Der Natrium- K_m -Wert von SGLT2 soll bei >100 mmol/l liegen (137, 337). Die Stöchiometrie für SGLT1 und SGLT3 beträgt Natrium:Glukose = 2:1 (65, 181), für SGLT2 vermutlich 1:1, möglicherweise auch 2:1 (137, 290, 329, 337). Neben Natrium können auch andere Kationen wie H^+ und Li^+ SGLT1 und SGLT3 antreiben (121, 180), für SGLT2 liegen hierzu bisher unter anderem wegen seines niedrigen Expressionslevels keine hinreichenden Untersuchungen vor. SGLT1 ist auch zum Transport von Harnstoff und Wasser fähig; für Wasser liegt das stöchiometrische Verhältnis bei Glukose:Natrium:Wasser = 1:2:264 (166, 174, 175, 176, 187, 329, 343).

Die Ähnlichkeit in den Kinetiken von SGLT1, SGLT3 und anderen Mitgliedern der SGLT1-Protein-Familie wie z. B. SMIT (105) deutet auf einen gemeinsamen Transportmechanismus hin. Für den Transport von Glukose durch SGLT1 wurde ein Kinetikmodell mit 6 Zustandsformen etabliert: Zusammengefasst binden zunächst zwei extrazelluläre Natriumionen an SGLT1. Durch Kippen/Neigen der Transmembranhelix 13 werden Aminosäurereste an den Positionen 439, 445, 457, 460, 468, 499 sowie 507 für die Glukosebindung zugänglich und der aus den Helices 10 bis 13 bestehende Glukose-Translokationspfad wird freigegeben; Natrium wird vermutlich über einen eigenen Pfad in der NH_2 -Terminus-Hälfte des Proteins durch SGLT1 transportiert. In Abwesenheit von Glukose fungiert SGLT1 über erleichterte Diffusion als Natriumtransporter (327, 329).

Bisher sind zwei die Familie der SGLT betreffende genetische Erkrankungen bekannt: Zum einen die intestinale Glukose-Galaktose-Malabsorption, hervorgerufen durch verschiedenartige Mutationen im SGLT1-Gen, und zum anderen die durch Mutationen im SGLT2-Gen verursachte familiäre renale

Glukosurie (329). Patienten mit Glukose-Galaktose-Malabsorption leiden bei peroraler Zufuhr von Galaktose und Glukose unter massiver Diarrhoe, meist vergesellschaftet mit einer milden renalen Glukosurie. Bei der familiären renalen Glukosurie tritt keine intestinale Malabsorption auf (329).

1.2 Bedeutung des anorganischen Phosphattransporters NaPi IIb

Zur Aufrechterhaltung struktureller und metabolischer Erfordernisse benötigt jede Zelle Phosphat. 30 % des Serum-Phosphats (Referenzbereich bei Erwachsenen 0,84 – 1,45 mmol/l) kommen in anorganischer Form (P_i) vor, 70 % sind organisch überwiegend an Proteine gebunden; Phosphat findet sich im Serum aber auch gebunden an Natrium-, Kalzium- und Magnesiumionen (145). Bei einem pH-Wert von 7,4 liegt anorganisches Phosphat zu 80 % als monovalentes $H_2PO_4^-$ vor und zu 20 % als divalentes HPO_4^{2-} (17, 158); es spielt in dieser Form eine wichtige Rolle als Puffersystem im Blut und bei der Ausscheidung von Säuren über die Nieren (145, 158). Phosphat ist in Form von Kalziumapatit wesentlicher Bestandteil von Knochen (~80 % der gesamten im menschlichen Körper befindlichen Phosphatmenge von ~700 g). Über den Darm werden täglich etwa 1000 mg Phosphat aufgenommen und bis zu 90 % davon wieder über die Nieren ausgeschieden (145). Intrazellulär wird Phosphat für energieverbrauchende Adenosintriphosphat(ATP)-abhängige Prozesse benötigt, die Energie elektrischer und chemischer Potenziale in ATP konvertierbar und umgekehrt (173, 264, 265). Phosphat ist zudem Bestandteil der Nukleotide (17, 145) und in die Synthese von Phospholipiden und *Second Messengern* wie cGMP (cyclisches Guanosinmonophosphat) oder cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) sowie die Phosphorylierung von Proteinen involviert.

Bei negativem elektrochemischem Potenzial über der Zellmembran kann anionisches Phosphat nicht durch einfache Diffusion in die Zelle gelangen; außerdem ist die Löslichkeit von an z. B. Ca^{2+} gebundenem P_i im Serum begrenzt, als dass eine ausreichend hohe Serum-Phosphatkonzentration erzielt

werden könnte, die aufgrund eines Konzentrationsgradienten eine passive Diffusion von Phosphat ins Zellinnere mit hier vorherrschenden relativ hohen Phosphatkonzentrationen erlauben würde. Daher ist ein Transportsystem nötig, das Phosphat gegen den elektrochemischen Gradienten mit Hilfe eines sekundär-aktiven Transports ins Zellinnere befördern kann; ein solches Transportsystem stellt die aus drei größeren Gruppen (NaPi-I, NaPi-II und NaPi-III) bestehende Klasse der Natrium-Phosphat-Kotransporter dar (322).

Die für die Regulation des intrazellulären Phosphathaushalts zuständige Proteinfamilie ist die Gruppe der NaPi-III-Transporter, deren Mitglieder praktisch ubiquitär in Vertebraten exprimiert werden (142). NaPi-III-Proteine wurden auch in *E. coli*, *S. cerevisiae* und *C. elegans* (6 Isoformen, bezeichnet als „Phosphatpermeasen“ (57), bei *E. coli* auch „Pit“ (71) und bei *S. cerevisiae* auch „Pho89“ (224) genannt) nachgewiesen. Zur selben Familie gehören die beim Menschen vorkommenden retroviralen Rezeptoren Glvr und Ram (Pit-1 und Pit-2 (131, 141)). Die Expressionsrate und die Transportaktivität der NaPi-III-Transporterfamilie werden durch die Höhe der extrazellulären Phosphatkonzentration reguliert (43, 141, 185, 323). Alle dieser Klasse zugehörigen Proteine weisen 10 bis 12 Transmembrandomänen auf (131, 185, 292).

Mitglieder der NaPi-I-Familie wurden vorwiegend in Niere, Leber und Gehirn nachgewiesen (320). Ähnliche Proteine wurden bisher beim Menschen, beim Kaninchen, bei der Ratte, bei der Maus und bei *C. elegans* gefunden. Die verschiedenen Orthologe sind zwischen 465 und 576 Aminosäurereste lang. Die Transportproteine besitzen 6 bis 10 Transmembrandomänen. Über die eigentliche Funktion der NaPi-I-Transporter können bislang keine eindeutigen Aussagen getroffen werden: So wird Phosphat vom Kaninchen-NaPi-I-Orthologen erst bei hohen Phosphatkonzentrationen transportiert, außerdem wurde eine Chloridleitfähigkeit nachgewiesen, die auf Chloridkanalblocker sensibel ist, und schließlich werden auch organische Anionen wie Harnsäure, Benzylpenicillin und Probenecid transportiert (32). Möglicherweise sind NaPi-I-Transporter in den Glukosemetabolismus in Leber, Niere und Gehirn involviert

(168); so soll Insulin in Hepatozyten und Nierenzellen die Phosphataufnahme über NaPi-I stimulieren. Eventuell sind NaPi-I-Transporter daher für die Phosphathomöostase in Organen mit hohem Phosphatbedarf und hohem Glukoseumsatz verantwortlich. Im Gehirn könnte NaPi-I auch an der Glutamataufnahme in Vesikel beteiligt sein (201).

Für die Kontrolle der Phosphathomöostase in mehrzelligen Organismen ist die stark regulierte Proteinfamilie NaPi-II (199, 320) verantwortlich. NaPi-II-Mitglieder steuern in verschiedenen Epithelien die Phosphataufnahme bzw. -abgabe. In Vertebraten werden sowohl die schnell regulierte renale Phosphatreabsorption (NaPi IIa) als auch die langsam regulierte intestinale Phosphatabsorption (NaPi IIb) durch NaPi-II-Transporter vermittelt (49, 78, 117, 182, 193, 199). Der renale Transporter NaPi IIa wird beim Menschen auf Chromosom 5q, der intestinale Transporter NaPi IIb auf Chromosom 4p kodiert. Das NaPi IIa-Protein besteht beim Menschen aus 639 Aminosäuren, das NaPi IIb-Protein aus 690 Aminosäuren (322).

NaPi IIa ist in der Niere für die kontrollierte Phosphatreabsorption in der *Pars convoluta* des proximalen Tubulus zuständig, hier werden ca. 80 % des im Glomerulus filtrierten Phosphats rückresorbiert. NaPi IIa wird auch im Gehirn exprimiert (122); in Zellen im dritten Hirnventrikel und in der Amygdala ist NaPi IIa wahrscheinlich durch Phosphatkonzentrationsmessung an der Regulation der Phosphathomöostase beteiligt; so wurde gezeigt, dass bei erhöhter Phosphatkonzentration im Liquor die renale Phosphatreabsorption trotz niedriger oder normaler Phosphatkonzentration im Plasma reduziert ist (122, 197). NaPi IIa-Knock-out-Mäuse sind lebensfähig, zeigen aber eine ausgeprägte Phosphaturie sowie Skelettanomalien (15).

NaPi IIb ist im Darm in der apikalen Membran von Enterozyten lokalisiert (117). Bei Mäusen wird NaPi IIb im Ileum exprimiert und fehlt in Duodenum und Jejunum fast vollständig; auch die Phosphatabsorption findet zumindest bei Mäusen überwiegend im Ileum und nur zu geringen Anteilen in Duodenum und Jejunum statt; bei Ratten scheint jeweils etwa ein Drittel der gesamten resorbierten Phosphatmenge im Duodenum und im Ileum aufgenommen zu

werden. Durch phosphatarmer Diät lassen sich die mRNA-Konzentration und die Expressionsrate von NaPi IIb in Jejunum und Ileum steigern, im Duodenum von Mäusen konnte lediglich eine Zunahme der NaPi IIb-mRNA ohne entsprechenden Anstieg der NaPi IIb-Expression nachgewiesen werden (237). NaPi IIb wird bei Säugern neben dem Dünndarm in einer Vielzahl weiterer Gewebe exprimiert wie z. B. Niere, Lunge, Pankreas, Speicheldrüsen (z. B. bei Schafen (294)) und Prostata (78). In humanem Brustdrüsengewebe und Prostata wurde zudem NaPi IIb-verwandte RNA gefunden (78, 321). In menschlicher Milch, Sperma-Flüssigkeit und im Speichel von Wiederkäuern ist Phosphat wichtig für die Pufferung sowie für metabolische Belange (260). Wahrscheinlich vermittelt NaPi IIb hier die sekundär-aktive Phosphat-Akkumulation an der basolateralen Membran und folglich die Phosphatsekretion. NaPi IIb wurde auch an der kanalikulären Membran von Hepatozyten und an der Bürstensaummembran von Cholangiozyten in Ratten detektiert; er ist hier möglicherweise an der Reabsorption von P_i aus Gallensekret beteiligt (87).

Die intestinale Natrium-abhängige Absorption von Phosphat wird durch eine große Anzahl an Hormonen und metabolischen Faktoren reguliert (51, 55, 116, 143). Es konnte gezeigt werden, dass die Expressionsrate des Typ IIb-Natrium-Phosphat-Kotransporters durch phosphatarmer Diät, 1,25-Dihydroxy-Vitamin D_3 (altersabhängig) (36, 97, 109, 140, 163, 235, 333), Glukokortikoide (10, 51, 336), Östrogene (334), den epidermalen Wachstumsfaktor (332), Wachstumshormon (9, 29, 83), IGF-I (295) und weitere Zytokine sowie metabolische Azidose (276) erhöht wird. Erniedrigung des extrazellulären pH-Wertes resultiert in einer geringen Zunahme der Transportrate (237). Für NaPi IIb wurden Antisense-Transkripte nachgewiesen, die durch Bildung von Sense-Antisense-mRNA-Komplexen möglicherweise die NaPi IIb-Expression reduzieren (81, 205, 341).

NaPi IIa wird durch Insulin (1, 106) und wie NaPi IIb durch phosphatarmer Diät, IGF-I (38, 198) und akut auch durch 1,25-Dihydroxy-Vitamin D_3 (158, 196, 198) stimuliert. Eine inhibitorische Wirkung auf NaPi IIa üben Parathormon (107,

198), Glukokortikoide (184, 198, 298), TGF- β (162), Dopamin (96), Calcitonin (340), das Atriale Natriuretische Peptid (108, 198) und chronisch 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃ (158, 198) aus. Parathormon wirkt vermutlich direkt auf NaPi IIa; so ist bei NaPi IIa-Knock-out-Mäusen die renale Phosphatreabsorption in der *Pars convoluta* des proximalen Tubulus nicht länger durch Parathormon beeinflussbar (344).

Die Regulation der Serum-Phosphatkonzentration erfolgt durch ein komplexes Zusammenwirken verschiedener Hormone: Calcitonin senkt die Kalzium- und die Phosphatkonzentration im Serum durch Stimulation der Knochenneubildung bzw. Hemmung der Osteoklasten und durch Förderung der Phosphat- und Kalziumausscheidung über die Nieren, stimuliert aber auch die Bildung von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃. Bei niedrigem Serum-Kalziumspiegel und hohem Serum-Phosphatspiegel werden die Parathormonsynthese und die Parathormonfreisetzung aktiviert. Parathormon fördert den Knochenabbau und damit die Freisetzung von Kalzium und Phosphat; in der Niere werden die Kalziumrückresorption, die Phosphatausscheidung und die Umwandlung von 25-Hydroxy-Vitamin D₃ zu 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃ stimuliert; Parathormon induziert die Herunterregulierung von NaPi IIa in der Niere, ein unmittelbarer Einfluss auf NaPi IIb konnte bisher nicht nachgewiesen werden (139). Letztlich sinkt durch Parathormon die Phosphatkonzentration im Blut, während die Kalziumkonzentration ansteigt. Die Bildung von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃ wird auch direkt durch einen niedrigen Kalzium- und Phosphatspiegel angeregt; 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃ fördert die (Rück-)Resorption von Kalzium und Phosphat im Darm und in den Nieren. Östrogene stimulieren in der Leber die Synthese von 25-Hydroxy-Vitamin D₃. Vermutlich werden die NaPi-II-Transkription, die -Translation und in der Folge auch die Expression im Darm und in der Niere bei phosphatarmer Diät durch Aktivierung der 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃-Synthese in der Niere gesteigert (51, 283, 296, 319).

Alle bisher untersuchten Orthologe der NaPi-II-Familie zeigen ähnliche Hydropathieprofile, was eine zumindest ähnliche dreidimensionale Struktur nahe legt. NH₂- und COOH-Terminus liegen intrazellulär (149, 156, Abb. 2). Die

exakte Anzahl der Transmembrandomänen ist noch nicht endgültig geklärt; die meisten Publikationen favorisieren Modelle mit 8 Membranpassagen sowie einer hydrophoben Helix oder zwei hydrophoben Helices, die eine Art Scharnier darstellen (200, 219). Die oft „große extrazelluläre Schleife“ genannte Struktur zwischen der 3. und 4. Transmembrandomäne ist *in vivo* glykosyliert, die Anzahl der Glykosylierungsstellen ist bei den einzelnen Spezies verschieden (111). In drei hydrophilen Regionen (ein Segment innerhalb der glykosylierten extrazellulären Schleife sowie die beiden Termini) bestehen wesentliche Unterschiede zwischen NaPi IIa und NaPi IIb: Ein Teil der großen extrazellulären Schleife zeigt deutliche Divergenzen in den Aminosäuresequenzen von NaPi IIa (27 bzw. 28 Aminosäuren) und NaPi IIb (45 Aminosäuren).

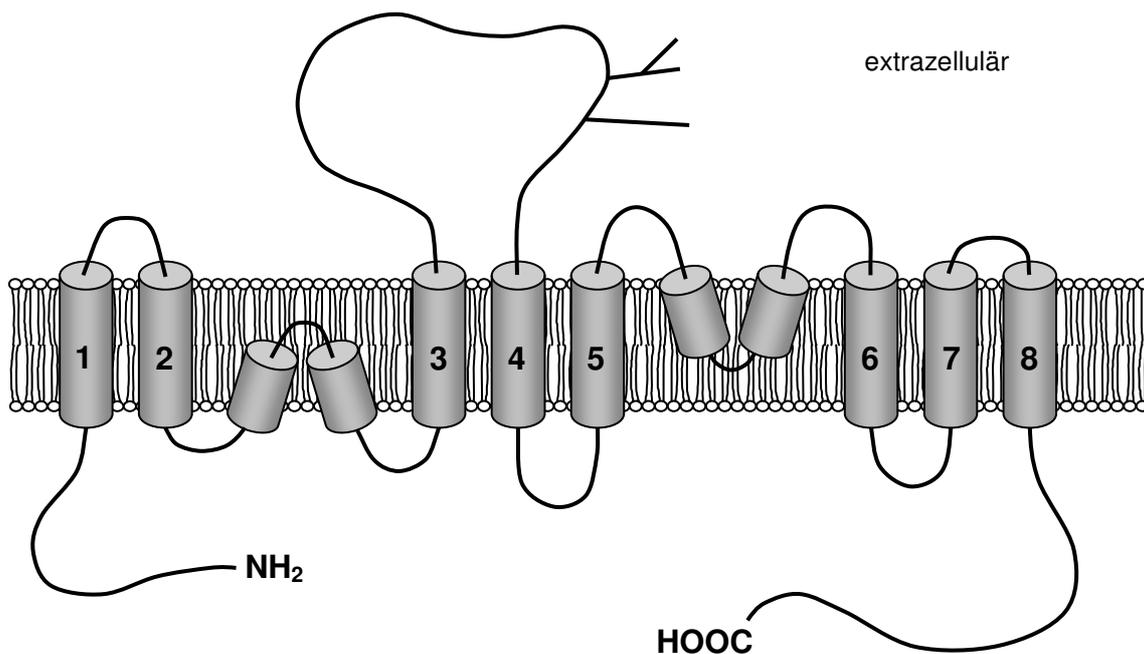


Abb. 2: Struktur des anorganischen Phosphattransporters NaPi IIb (modifiziert nach 322).

Im Bereich des COOH-Terminus finden sich zwei Motive, die bei der Regulation der Transporter eine Rolle spielen könnten: bei beiden Transportern am äußersten Terminus eine PDZ-bindende Domäne (Ala/Xxx-Thr-Xxx-Leu/Phe) und ausschließlich bei NaPi IIb eine Kette von 6 bis 10 Cystein-Resten. Die

Unterschiede in der Aminosäuresequenz des Carboxyterminus tragen wahrscheinlich zu der unterschiedlichen zellulären Expression der zwei NaPi-II-Transporter bei (322). Diese Divergenz am COOH-Terminus gelegener 50 bis 60 Aminosäuren könnte aus einer *Frame-Shift*-Mutation heraus entstanden sein. *Splice-Site*-Mutationen könnten den bei NaPi IIa und NaPi IIb unterschiedlichen NH₂-Terminus erklären. Eine komplette Deletion des NH₂-Terminus hat keinerlei Effekt auf die Expressionsrate von NaPi-II (322).

Alle NaPi-II-Transporter zeigen vergleichbare Substrataffinitäten zwischen 30 und 250 µmol/l für Phosphat und zwischen 35 und 60 mmol/l für Natrium (86, 322). NaPi IIb weist K_m-Werte von ~50 µmol/l für P_i und ~40 mmol/l für Natriumionen auf (237). Natrium und Phosphat werden in einem Verhältnis von 3:1 transportiert (86). Die maximale Transportrate hängt ebenso wie die Affinität zu Natrium vom Membranpotenzial ab (84, 85, 86). Die für die unterschiedliche pH-Abhängigkeit von NaPi IIa und NaPi IIb verantwortliche Aminosäuresequenz konnte auf drei Aminosäuren eingegrenzt werden; so erlangte NaPi IIa durch Ersetzen der Sequenz 478REK durch 500GNT (von NaPi IIb stammend) die pH-Abhängigkeit von NaPi IIb (60).

1.3 Bedeutung des Chloridkanals ClC-2

Anionenkanäle erlauben als Proteinporen in biologischen Membranen die passive Diffusion negativ geladener Ionen entlang ihres elektrochemischen Gradienten. Das am häufigsten vorkommende Anion im menschlichen Organismus ist Chlorid (Referenzbereich im Serum 97 – 108 mmol/l, intrazellulär ~4 mmol/l), das über drei bisher bekannte größere sowie weitere kleinere Genfamilien von Chloridkanälen durch Membranen diffundiert. Den Chloridkanälen obliegen folgende drei hauptsächliche Funktionen: Zellvolumenregulation und Ionenhomöostase, transepithelialer Transport von Salz und Flüssigkeiten sowie elektrische Exzitabilität. Die Aufrechterhaltung der Ionenhomöostase einschließlich pH-Regulation und die Zellvolumenregulation

erfolgen häufig gemeinsam mit einer Vielzahl anderer Ionentransporter bzw. -kanäle wie z. B. dem Na⁺/H⁺-Austauscher; aus Gründen der Elektroneutralität und des Chlorid-Recyclings sind Chloridkanäle als Chloridshunt involviert. Bei extrazellulärer Hypotonizität öffnen sich schwellungsaktivierte Kalium- und Chloridkanäle, um durch Abgabe von Ionen die intrazelluläre Ionenkonzentration der extrazellulären anzugleichen. Durch polarisierte Expression in Epithelien spielen Chloridkanäle eine wichtige Rolle bei der Sekretion bzw. Reabsorption z. B. in Bronchien, Speicheldrüsen, Niere, Darm etc. Auch an der Exzitabilität z. B. von glatten Muskelzellen und Skelettmuskelzellen sowie Neuronen sind Chloridkanäle beteiligt (129).

Die erste der drei größeren Chloridkanal-Familien bildet die ClC-Gruppe, auf die weiter unten näher eingegangen werden soll.

Die zweite stellt der Zystische-Fibrose-Transmembran-Leitfähigkeits-Regulator (CFTR) dar. Er gehört zur sogenannten ABC-Transporter-Superfamilie und besitzt 12 Transmembrandomänen, zwei Nukleotid-bindende Falten (NBF), eine regulatorische R-Domäne und am Carboxyterminus eine PDZ-bindende Domäne (129, 195, 261). Das Öffnen dieses Kanals wird durch intrazelluläres ATP und durch Phosphorylierung durch cAMP- oder cGMP-abhängige Kinasen (Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase C (PKC)) kontrolliert. Expressionsorte sind u. a. Darm, Luftwege, sezernierende Drüsen, Gallengänge und Epididymis. Eine Splicevariante kommt auch im Herzmuskel vor (123, 204). Neben seiner Funktion als eigenständiger Chloridkanal spielt er auch eine Rolle in der Regulation anderer Kanäle (129). Die verschiedenartigen Mutationen im CFTR-Gen (in ~70 % delta-F-508-Mutation) zu Grunde liegende und autosomal-rezessiv vererbte zystische Fibrose (auch als „Mukoviszidose“ bezeichnet) weist Störungen der Chlorid- und Flüssigkeitssekretion (beeinträchtigte Chloridsekretion und gesteigerte Natriumreabsorption) auf, die in der Ausbildung eines sehr zähen Sekrets in vielen Organen resultieren. Dieses dyskrine Sekret führt zu sich im Verlauf aggravierenden Schädigungen von insbesondere Lunge und Pankreas, aber auch Darm, Leber und Keimdrüsen und zu Elektrolytstörungen.

Zur dritten und größten bekannten Familie von Chloridkanälen zählen die Liganden-gesteuerten GABA- und Glycin-Rezeptor-Kanäle, die zusammen mit nikotinergen Acetylcholinrezeptoren zur Superfamilie Liganden-gesteuerter Ionenkanäle (LGIC) gehören (129). Deren Untereinheiten haben jeweils 4 Transmembrandomänen und kombinieren sich zu pentameren Kanälen. Vermutlich existieren mindestens 4 weitere Familien von Chloridkanälen: Es wurde eine Familie von mutmaßlich intrazellulären Chloridkanälen identifiziert, die wahrscheinlich eine einzelne Transmembrandomäne besitzen: die p64- oder CLIC-Familie (18, 157, 234, 286). Eine andere Genfamilie stellt die Gruppe der Kalzium-aktivierten Chloridkanäle dar: einerseits native Kalzium-aktivierte Chloridkanäle (u. a. involviert in die Exzitabilität von Neuronen und glatten Muskelzellen) und andererseits die CLCA- oder CaCC-Familie, die für Proteine mit 4 oder 5 putativen Transmembrandomänen kodiert und möglicherweise eine Rolle bei der Zelladhäsion spielt. Die molekulare Identifizierung einer Gruppe von schwellungsaktivierten Chloridkanälen (als „I_{Cl,swell}“ bezeichnet) ist bislang nicht gelungen. Auch bei Aminosäuretransportern wie z. B. den exzitatorischen Aminosäuretransportern EAAT konnte eine Chloridleitfähigkeit nachgewiesen werden (129).

Im Folgenden soll die CIC-Genfamilie näher dargestellt werden, deren Kanäle sowohl bei Pro- als auch bei Eukaryonten vorkommen. Bei Säugern umfasst die CIC-Familie bislang 9 verschiedene Kanäle, die in Plasmamembranen sowie intrazellulären Kompartimenten verschiedener Gewebe nachgewiesen wurden. Aufgrund von Sequenzanalysen können diese 9 Kanäle in drei Klassen eingruppiert werden. Die erste Klasse besteht aus Plasmamembrankanälen (CIC-0, CIC-1, CIC-2, CIC-Ka sowie CIC-Kb), wohingegen den zwei anderen Klassen (CIC-3, CIC-4, CIC-5 und CIC-6, CIC-7) Kanäle mit vorwiegender Lokalisation in intrazellulären Kompartimenten zugehören (129). Einige CIC-Kanäle wie z. B. die CIC-K-Kanäle sind mit β -Untereinheiten assoziiert, die Barttin zur funktionellen Expression benötigen (20, 76).

Alle bisher untersuchten ClC-Kanäle sind Dimere; die Kontaktstelle wird geformt von jeweils 4 Helices. ClC-0, ClC-1 und ClC-2 weisen innerhalb eines Monomers jeweils eine Pore auf (177, 189, 192, 250, 316), durch welche Anionen diffundieren. Für diese Kanäle wurde ein sogenanntes „*Double-Barrel*“-Modell propagiert (169, 177), wonach sie nach Dimerisation zwei identische Poren besitzen, die unabhängig voneinander durch Depolarisation im 10 ms-Bereich geöffnet werden können. Ein gemeinsames „Tor“ kann beide Poren gleichzeitig verschließen. Dieses Tor wird durch Hyperpolarisation geöffnet und im 10 Sekunden- bis Minutenbereich wieder geschlossen.

Die bakteriellen ClC-Kanäle sind aus 18 α -Helices zusammengesetzt, wobei die meisten die Membran nicht vollständig überspannen. Die 13 hydrophoben Domänen sind mit „D1“ bis „D13“ bezeichnet (Abb. 3); die Domänen D1 bis D12 durchziehen vermutlich die Zellmembran (129, 133).

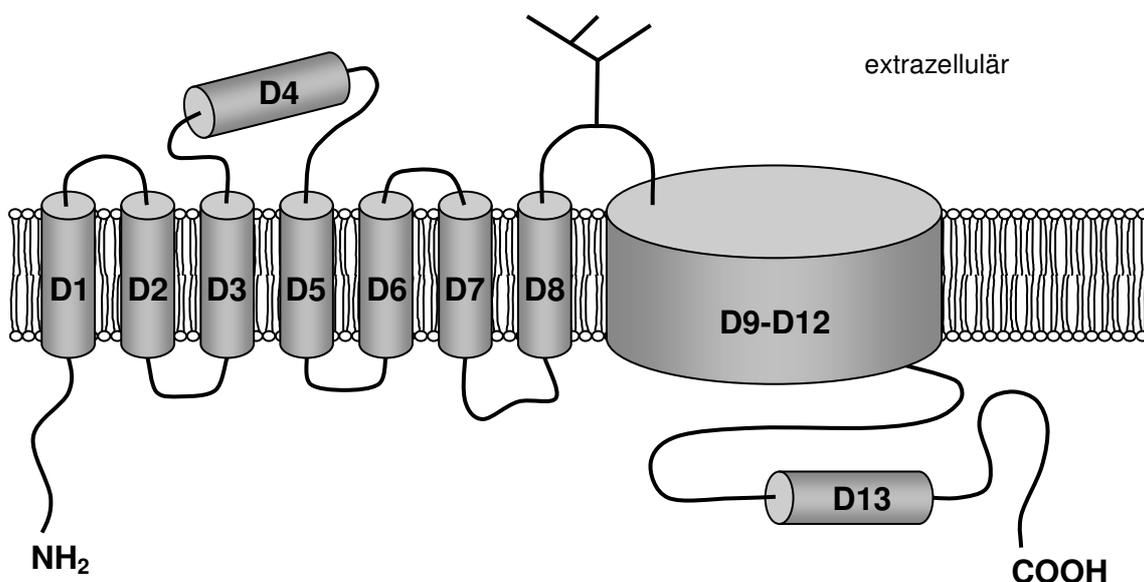


Abb. 3: Struktur des Chloridkanals ClC-2 (modifiziert nach 133).

D13 liegt vollständig intrazellulär und ist Teil einer von zwei in ClC-Kanälen vorkommenden sogenannten CBS-Domänen (benannt nach der Cystathionin- β -Synthase), die in vielen Proteinen konserviert ist und deren Funktion noch unbekannt ist. Eine zwischen den beiden CBS-Domänen liegende Prolin-reiche Region des ClC-5-Kanals interagiert möglicherweise mit Ubiquitin-Protein-

Ligasen (254). Sowohl Amino- als auch Carboxyterminus sind im Zytosol lokalisiert (100). Die Schleife zwischen D8 und D9 ist glykosyliert und extrazellulär gelegen. Die breite hydrophobe Region am Carboxyterminus (D9 bis D12) besteht aus 6 α -Helices. Wahrscheinlich wird die oben beschriebene Pore von den Domänen D3 bis D5 eingefasst (129).

Viele (möglicherweise auch alle) ClC-Kanäle sind spannungsabhängig und werden zudem von (extrazellulären) Anionen einschließlich Chlorid und dem pH-Wert (40, 77, 232, 233, 247) moduliert. Für ClC-1 wird z. B. vermutet, dass ein Asparaginsäurerest am extrazellulären Ende der hydrophoben Domäne D1 als Spannungssensor fungiert (129); nach Mutation (Glycin statt Asparaginsäure) kehrte sich die Spannungsabhängigkeit um. Andere Punktmutationen in verschiedenen Regionen von ClC-0 (178) und ClC-1 (324) zeigen ähnliche Effekte, auch durch verschiedenartige Punktmutationen in der D3/D4-Region und in D5 konnte die Richtung der Spannungsabhängigkeit umgekehrt werden. Punktmutationen im Verbindungsstück zwischen D2 und D3 (177), in der Region zwischen D3 und D4 (279) und in einer Region nach D12 (232) veränderten die Ionenselektivität. Über eine Regulation durch *Second Messenger* oder Proteinkinasen ist bisher nur wenig bekannt.

ClC-0 stellt den wesentlichen Chloridkanal für das elektrische Organ des Zitterrochens dar (127, 325, 326). ClC-1 wird vorwiegend an der äußeren sarkolemmalen Membran von Skelettmuskelzellen exprimiert und ist hier für den Großteil der Ruheleitfähigkeit verantwortlich (277). Seine Inaktivierung z. B. durch Mutation führt zu Myotonie (148, 278), z. B. beim Menschen zur autosomal-rezessiv (Becker-Typ) oder dominant (Thomsen-Typ) vererbten Myotonia congenita. Bislang sind mehr als 40 verschiedene Mutationen bekannt (129, 148, 164, 188, 229). Die beiden renalen ClC-K-Kanäle sind in den transepithelialen Transport in verschiedenen Nephronsegmenten und im Innenohr involviert (76); Mutationen führen beim Menschen zum Bartter-Syndrom Typ III mit Salzverlust, Hypotonie, hypokaliämischer Alkalose sowie Hypokalzämie (263) und bei Mäusen zum renalen Diabetes insipidus (186). ClC-K-Kanäle bilden mit Barttin einen heteromeren Komplex (76). ClC-3 ist

vorwiegend intrazellulär in Endosomen und synaptischen Vesikeln in Gehirn, Niere, Leber, Herz, Pankreas, Nebenniere und Skelettmuskel lokalisiert. CIC-3-Knock-out-Mäuse zeigen eine Degeneration von Hippokampus und Retina (281). CIC-4 ist bisher nur wenig untersucht; er wird vor allem in Vesikeln von Gehirn (Hippokampus) und Skelettmuskel, aber auch in Herz, Leber, Milz und Niere exprimiert (128). CIC-5 ist ein endosomaler Kanal, der an der renalen Endozytose beteiligt ist. Weitere Lokalisationen sind Leber, Gehirn, Testis und Darm (280, 293). Mutationen im CIC-5-Gen führen zur X-chromosomalen Dent-Erkrankung, die durch Proteinurie, Hyperkalzurie und Hyperphosphaturie mit Nephrolithiasis und Rachitis gekennzeichnet ist (226, 251, 330). Über die Funktion des praktisch ubiquitär exprimierten, intrazellulär lokalisierten CIC-6-Kanals ist bislang nichts bekannt. CIC-7 ist ein lysosomaler Chloridkanal, der stark exprimiert wird in Osteoklasten. Seine Mutation führt zu Osteopetrosis (sogenannte Marmorknochenkrankheit) und retinaler Degeneration (129).

CIC-2 ist beim Menschen auf Chromosom 3q27 lokalisiert. Er wird durch Hyperpolarisation, Zellschwellung (extrazelluläre Hypotonizität) und sauren pH aktiviert (100, 133, 285) und ist sensibel auf die intra- und extrazelluläre Chloridkonzentration (133). Er wird praktisch ubiquitär, besonders aber in Gehirn (v. a. Pyramidenzellen des Hippokampus und Purkinje-Zellen des Cerebellums (48, 268)), Retina (bipolare Zellen und retinales Pigmentepithel (73)), Niere, Lunge und Darm exprimiert. In der Lunge weisen insbesondere die apikalen Membranen von Zilienzellen und wahrscheinlich auch Typ II-Pneumozyten hohe Expressionsraten von CIC-2 auf (170, 202). Weitere Expressionsorte stellen Herz, Pankreas und Leber dar (285). Im Darm von Mäusen ist CIC-2 konzentriert auf Regionen in der Nähe von *Tight Junctions* (104), bei Ratten in den Dünndarm-Villi v. a. in den lateralen Membranen von Enterozyten und im Kolon v. a. in den basolateralen Membranen luminaler Enterozyten. Beim Menschen findet sich CIC-2 vorwiegend intrazellulär perinukleär (möglicherweise im Golgi-Apparat), aber auch im apikalen Bereich von luminalen Kolon-Enterozyten (104, 170, 203). Die Unterschiede im Verteilungsmuster könnten durch eine divergente Aminosäuresequenz bedingt

sein: Eine bei der humanen Isoform vorhandene mögliche Bindungsstelle für PKA in der COOH-Terminus-Region fehlt bei der Ratten-Isoform. Es werden mehrere Splice-Varianten beschrieben, von denen einige möglicherweise gewebsspezifisch sind (44, 45, 46, 172).

CIC-2 zeigt wie CIC-0 und CIC-1 eine Anionenselektivität von $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$ (92, 133, 255, 285). Er wird durch DIDS (4,4'-Diisothiocyanostilben-2,2'-Disulfonat), Diphenylcarboxylat, NPPB (5-Nitro-2-(3-Phenylpropylamino)-Benzoat), Cd^{2+} und Zn^{2+} gehemmt (47, 92, 255, 285). Durch Hyperpolarisation wird CIC-2 langsam aktiviert (46, 92, 100, 133, 220, 255, 285, 331) und zeigt einen einwärtsrektifizierenden Strom; in Oozyten sind bei -180 mV mehr als 20 Sekunden für das Erreichen eines *Steady State* erforderlich (285). Die Schwelle für die Spannungsaktivierung hängt wahrscheinlich vom Expressionssystem ab: in *Xenopus*-Oozyten bei -60 bis -80 mV (46, 92, 285), in transfizierten Säugetierzellen bei -30 bis -40 mV (220, 255, 331). Geschwindigkeit und Ausgestaltung der Aktivierung variieren stark zwischen einzelnen Zelltypen und Experimenten und sind möglicherweise von Temperatur und weiteren Faktoren wie bisher unbekanntem Untereinheiten abhängig. Eventuell bildet CIC-2 auch Tetramere mit einer dann zehnfach höheren Leitfähigkeit (238). Ansteigende extrazelluläre Anionenkonzentrationen fördern das Schließen des Kanals (233). CIC-2 wird durch hypotonizitätsinduzierte Zellschwellung aktiviert (92, 100, 133, 255, 331); möglichenfalls ist CIC-2 daher in die Zellvolumenregulation involviert (92, 100, 331). Auch ein Senken des extrazellulären pH-Wertes führt zu einer Aktivierung von CIC-2 (92, 133, 231, 255). pH-Werte über 7,4 bedingen ein Schließen des Kanals. Die Aktivierung von CIC-2 durch Hyperpolarisation, Zellschwellung oder niedrigen extrazellulären pH-Wert kann durch Mutationen bzw. Deletionen in einer Struktur im zytoplasmatischen Aminoterminus („Inaktivierungsdomäne“, die aus ca. 15 Aminosäuren besteht) und in einer Aminosäuresequenz zwischen den Domänen D7 und D8 aufgehoben werden; Mutationen oder Deletionen in diesen Bereichen führen zu konstitutiv offenen Kanälen ohne pH-Abhängigkeit (100, 133). Eine Interaktion des Aminoterminus mit anderen

Proteinen zur CIC-Regulation ist denkbar; so kann der Aminoterminus von CIC-2 z. B. Actin binden (2). CIC-2 wird vermutlich auch durch Arachidonsäure, Amidation mit Glycinmethylester und Behandlung mit säureaktiviertem Omeprazol aktiviert (52). Die oben beschriebene CIC-2-Stimulation durch einen niedrigen extrazellulären pH-Wert ist wahrscheinlich PKA-abhängig. Humaner CIC-2 präsentiert insgesamt 7 mögliche Phosphorylierungsstellen am C-Terminus und zwei am N-Terminus. Zwei Konsensusstellen (beim Menschen RRAT655 und RGET691, beim Kaninchen RRQS651 und KRKS749) könnten für die bei Mensch und Kaninchen beobachtete Aktivierung von CIC-2 durch PKA in Frage kommen (53). Allerdings existieren zu einer möglichen CIC-2-Regulation durch cAMP-abhängige Phosphorylierung bislang widersprüchliche Aussagen (92, 133, 183); im Gegensatz zu Kaninchen- und humanem CIC-2 fehlt Ratten-CIC-2 eine zytoplasmatische Konsensusstelle für die PKA-abhängige Phosphorylierung, aber auch die Kaninchen-Isoform ist insensitiv auf eine reine cAMP-Erhöhung (92). An Position 82 besitzen die CIC-2-Orthologen von Mensch, Maus und Kaninchen mit einem Serinrest eine mögliche Phosphorylierungsstelle für die Serum- und Glukokortikoid-induzierbare Kinase (SGK) (215). Bei den in der vorliegenden Arbeit dargestellten Untersuchungen wurden u. a. CIC-2-Mutanten verwendet, bei welchen durch Substitution mit Alanin (^{S82A}CIC-2) diese Phosphorylierungsstelle eliminiert bzw. durch Substitution mit Aspartat (^{S82D}CIC-2) der phosphorylierte und damit aktivierte Zustand imitiert werden sollte (215).

Es wurde berichtet, dass „CIC-2-ähnliche“ native Ströme durch Phosphorylierung beeinflusst werden (42, 209). Solche CIC-2-ähnlichen Ströme werden in Gliazellen (79, 208), *Plexus-choroideus*-Zellen (135, 136), Osteoblasten (42), pankreatischen Azinuszellen (37), Speicheldrüsenzellen (11, 150, 220), Leydig-Zellen (27, 209), Sertoli-Zellen (27) und T84-Kolon-Epithelzellen (89, 90) beobachtet. Ein Nachweis, dass diese Ströme durch CIC-2 vermittelt werden, ist bisher nicht gelungen; möglicherweise sind regulatorische Untereinheiten für die Veränderungen der Kanaleigenschaften verantwortlich.

Die in apikalen Membranen der fetalen Lunge detektierten CIC-2-Kanäle werden nach der Geburt herunterreguliert (202, 203); CIC-2-Kanäle scheinen durch Chlorid- und Flüssigkeitssekretion an der Entwicklung der fetalen Lunge beteiligt zu sein (22, 23, 202). Die CIC-2-Knock-out-Maus weist jedoch (ebenso wie die CFTR-Knock-out-Maus) eine normale Lungenentwicklung und bei Geburt eine normale Lungenmorphologie auf (22, 27). Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF), ein Mitglied der Heparin-bindenden Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Familie (FGF-7), ist in der Lage, die Expression von CIC-2 in der fetalen Lunge von Ratten zu stimulieren (21).

In manchen Neuronen (z. B. Pyramiden-Zellen) blockiert CIC-2 eventuell durch das Verhindern einer Zunahme der intrazellulären Chloridkonzentration über die Gleichgewichtskonzentration hinaus eine exzitatorische Antwort auf GABA (191, 268, 270). Postsynaptische GABA A- und Glycin-Rezeptoren sind Liganden-aktivierte Chloridkanäle, die abhängig von der intrazellulären Chloridkonzentration hyperpolarisierende (inhibitorische Wirkung) oder depolarisierende (exzitatorische Wirkung) Ströme hervorrufen (191). So konnte z. B. in Hinterwurzelganglionneuronen durch Transfektion mit CIC-2 die GABA-Antwort von exzitatorisch in inhibitorisch geändert werden (271). In erwachsenen Ratten ist CIC-2 vorwiegend in der Nähe inhibitorischer Synapsen lokalisiert (262). *In-situ*-Hybridisierung zeigte im Rattengehirn eine breite Verteilung von CIC-2 sowohl in Zellkörpern und Dendriten von Neuronen als auch in Astrozyten, hier besonders in den Zellfortsätzen mit Kontakt zu Neuronen und Blutgefäßen (48, 262, 268).

CIC-2 spielt möglicherweise eine Rolle bei der IGF-I-induzierten Regulation des Wachstums glatter Gefäßmuskelzellen im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen (41).

CIC-2-Knock-out-Mäuse weisen eine Degeneration von Photorezeptoren und männlichen Keimzellen auf (27). CIC-2 wird sowohl auf der cis- und trans-Seite der Blut-Testis-Schranke in Sertoli-Zellen als auch in Leydig-Zellen exprimiert. Die *Tubuli seminiferi* von Knock-out-Mäusen zeigen sich vollständig mit abnormen Sertoli-Zellen gefüllt; Keimzellen degenerieren bereits im Stadium der Meiose I. CIC-2 könnte an der Regulation des pH-Wertes im Bereich von

besonders vulnerablen Zellen (Keimzellen und Photorezeptoren) und von Blut-Organ-Schranken (gebildet von Sertoli-Zellen sowie Zellen des retinalen Pigmentepithels) beteiligt sein. Leydig-Zellen und Zellen des retinalen Pigmentepithels sind für die Ernährung bzw. Versorgung von Keimzellen und Photorezeptoren verantwortlich; durch Laktattransport über Leydig- und Pigmentepithelzellen würden pH-Wert-Änderungen entstehen, die bei inaktivem oder fehlendem CIC-2 möglicherweise nicht mehr ausgeglichen werden könnten und zum Untergang von Keimzellen und Photorezeptoren führen könnten (27).

1.4 Bedeutung der Serum- und Glukokortikoid-induzierbaren Kinase 1 und ihrer verwandten Kinasen SGK2, SGK3 und PKB

Signaltransduktion von extrazellulär nach intrazellulär erfolgt über membranständige sowie intrazelluläre Mechanismen. Hierin sind unter anderem Enzyme wie Phospholipasen, Phosphatasen und Proteinkinasen involviert. Letztere, die auch die sogenannte Serum- und Glukokortikoid-induzierbare Kinase (SGK) mit einschließen, katalysieren die Bindung eines Phosphatrestes aus ATP an eine Aminosäure (Serin, Threonin, Tyrosin) innerhalb bestimmter Sequenzen des zu regulierenden Proteins. Eine solche Aminosäuresequenz, die von drei Isoformen der SGK erkannt wird, stellt z. B. Arg-Xxx-Arg-Xxx-Xxx-Ser/Thr dar (146, 147, 160, 161); aber auch für Proteine, die diese Sequenz nicht aufweisen, konnte eine Regulation durch die SGK nachgewiesen werden. Durch die Phosphorylierung kommt es infolge lokaler Ladungsänderungen z. B. zu Konformationsänderungen mit Freigabe oder Verschließen von Bindungsstellen oder zu Änderungen in der Substrat-Affinität. Letztlich werden auf diese Weise Vorgänge blockiert bzw. verlangsamt oder stimuliert (230).

Die oben genannte Serum- und Glukokortikoid-induzierbare Kinase zählt zur Gruppe der sogenannten AGC-Proteinkinasen, der die Proteinkinase A (PKA), die Proteinkinase B (PKB), die Proteinkinase C (PKC) sowie die Proteinkinase

G (PKG) zugehören. Die SGK1 wurde 1993 in Brustkrebszellen von Ratten entdeckt, in welchen innerhalb von 30 Minuten nach Inkubation der Zellen mit Serum oder Glukokortikoiden die Konzentration von SGK-mRNA stark anstieg (82, 314, 315).

Alle bisher untersuchten Eukaryonten zeigen eine hohe SGK-Homologie (98, 305, 306). Zwischenzeitlich wurden zwei Isoformen der SGK entdeckt (SGK2 und SGK3), die zu 80 % mit SGK1 identisch sind (147). Humane SGK1 ist auf Chromosom 6 lokalisiert und besteht aus 433 Aminosäuren bei einem Molekulargewicht von 49 kDa; SGK2 wird auf Chromosom 20 und SGK3 (429 Aminosäuren, 49 kDa) auf Chromosom 8 kodiert (54, 147, 306). Von humaner SGK2 existieren zwei Splicevarianten, SGK2 α mit 41,1 kDa und 367 Aminosäuren und SGK2 β mit 47,6 kDa und 427 Aminosäuren.

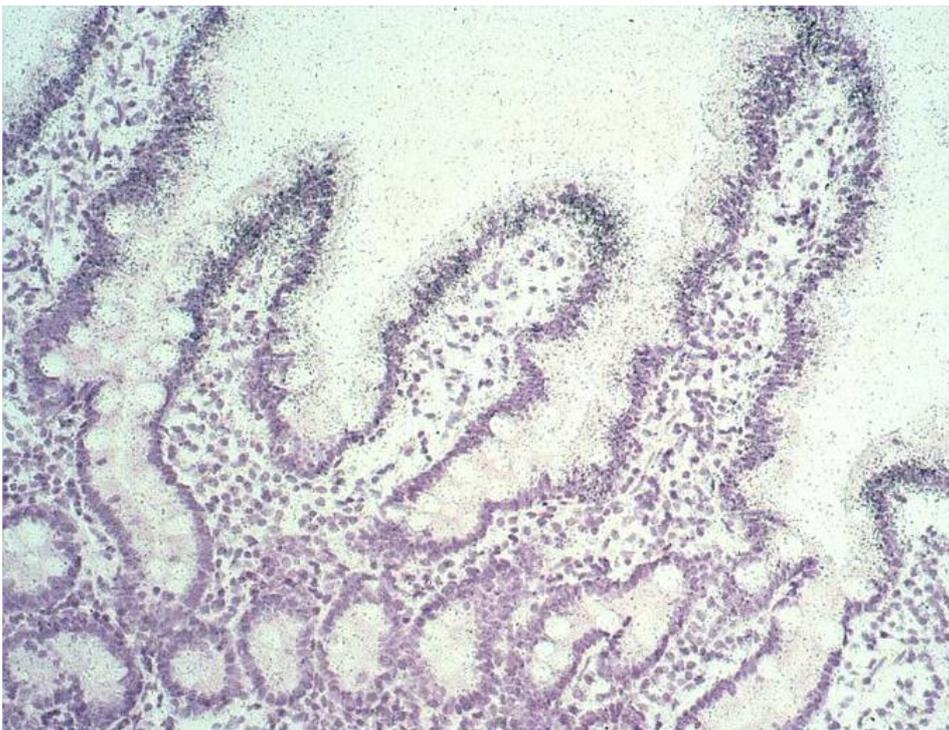


Abb. 4: *In-situ*-Hybridisierung zeigt eine selektive Expression von SGK1-mRNA in den Villi von Enterozyten des menschlichen Dünndarms. Zu geringeren Anteilen lässt sich SGK1 auch im Interstitium nachweisen (216).

SGK1 und SGK3 kommen praktisch in allen humanen Geweben vor einschließlich Darm, Pankreas, Leber, Herz, Lunge, Skelettmuskel, Plazenta, Niere und Gehirn (147, 159, 171, 304). SGK1 zeigt insbesondere im apikalen

Bereich von Enterozyten menschlicher Dünndarmzotten hohe Expressionsraten und ist hier mit der Ubiquitinligase Nedd4-2 kolokalisiert (Abb. 4, Abb. 6); in Kryptenzellen hingegen findet sich keine SGK1 (216, 307). Bei der Lungenfibrose, der zystischen Fibrose, der Colitis ulcerosa und beim Morbus Crohn wurden exzessiv erhöhte SGK1-Transkriptionsraten nachgewiesen (300, 303, 307). SGK2 wird vorwiegend in epithelialem Gewebe von Pankreas, Leber, Gehirn und Niere exprimiert (146, 147). Die katalytische Domäne der SGK ist zu 80 % mit der von PKB identisch (160). PKB erkennt dieselbe Konsensussequenz wie SGK (Arg-Xxx-Arg-Xxx-Xxx-Ser/Thr) (146, 147, 215).

SGK1 wird überwiegend transkriptional reguliert, eine Stimulation der Transkription erfolgt neben Glukokortikoiden (30, 314, 315) auch durch Mineralokortikoide wie Aldosteron über einen sogenannten Typ I-Rezeptor (30, 39, 50, 206, 207, 259) sowie durch TNF- α , TGF- β und weitere Zytokine (12, 160, 212), Thrombin, follikelstimulierendes Hormon (FSH) und luteinisierendes Hormon (LH) (5, 6, 98, 240). Auch Wundheilungsprozesse (126), fibrosierendes Gewebe (80, 154, 307), Schädigung von Neuronen (125), eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration und hyperosmolares Milieu mit nachfolgender Zellschrumpfung können die Transkription steigern (5, 50, 144, 160, 161, 304, 305). Eine wichtige Rolle im Rahmen der Signaltransduktion für die Transkriptionsregulation von SGK1 spielen cAMP (144), PKC (159), Phosphatidylinositol-3-Kinase (98, 221) sowie SAPK2 (auch als „p38“ bezeichnet) (58, 194, 308). Durch Heparin wird die SGK1-Transkription inhibiert (62). Für SGK2 und SGK3 konnte bislang keine transkriptionale Regulation nachgewiesen werden (160).

Neben einer Regulation auf Transkriptionsebene kann die SGK auch direkt durch Phosphorylierung aktiviert werden. Hierfür ist im ersten Schritt eine Aktivierung der Phosphoinositid-abhängigen Proteinkinasen 1 (PDK1) und 2 (PDK2) durch die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) erforderlich (3, 19, 146, 147, 221). Im zweiten Schritt – ausgelöst durch Insulin, IGF-I, FSH oder oxidativen Stress (94, 241) – wird SGK1 mittels PDK1 an der Position Ser422 (humane SGK2 an Ser356, humane SGK3 an Ser419, humane PKB an

Ser473) phosphoryliert; dieser Reaktionsschritt ist inhibierbar durch den PI3K-Blocker Wortmannin und daher PI3K-abhängig. Nachfolgend wird durch diese erste Phosphorylierung eine zweite Phosphorylierung durch PDK2 an Position Thr256 (SGK2: Thr193, SGK3: Thr253, PKB: Thr308) ermöglicht und dadurch die SGK aktiviert (146, 221, 223). Auch durch Phosphorylierung an Thr369 über PKA und cAMP ist eine Aktivierung der SGK möglich (223); um die SGK allerdings maximal zu aktivieren, ist die oben beschriebene Phosphorylierung durch PDK1 und PDK2 erforderlich, die ihrerseits aber durch bereits erfolgte Thr369-Phosphorylierung erleichtert wird (223).

Eine weitere Variante der Aktivierung der SGK besteht in der Stimulation durch die ERK5 (*Extracellular Signal-regulated Protein Kinase 5*, zur Familie der MAP-Kinasen gehörend), die ohne eine Phosphorylierung von Thr256 auskommt und möglicherweise ihrerseits von Wachstumsfaktoren aktiviert wird (110).

Durch Austauschen der Phosphorylierungsstelle Ser422 der SGK1 durch Aspartat entsteht die konstitutiv aktive Mutante ^{S422D}SGK1, da durch Aspartat der phosphorylierte Zustand imitiert wird (146, 304); entsprechend lässt sich durch Ersetzen der Aminosäuren Thr308 und Ser473 durch Aspartat bei PKB die konstitutiv aktive PKB-Mutante ^{T308DS473D}PKB erzeugen (3, 4). Wenn bei SGK1 Lysin an Position 127 durch Asparagin substituiert wird, resultiert hieraus durch Destruktion der katalytischen Untereinheit die inaktive Mutante ^{K127N}SGK1 (146). PKB wird durch Aminosäurenaustausch an Thr308 und Ser473 durch Alanin dauerhaft inaktiviert (bezeichnet als inaktive PKB-Mutante ^{T308AS473A}PKB (215)).

Die Wirkung der SGK auf ein Membranprotein ist zum Teil von weiteren Proteinen wie z. B. Nedd4-2 oder NHERF (*Sodium-Hydrogen-Exchanger Regulating Factor*) vermittelt bzw. abhängig (222).

Für einige wichtige Transporter bzw. Kanäle wurde bereits eine entscheidende Rolle der SGK in deren Regulation nachgewiesen. So bewirkt die SGK z. B. beim renalen epithelialen Natriumkanal ENaC über die Aldosteronwirkung eine Stimulation mit nachfolgender Natriumretention (4, 25, 39, 88, 112, 144, 159,

206, 222, 252, 259, 303); exzessiv gesteigerte ENaC-Aktivität beim Liddle-Syndrom (verursacht durch Mutationen in der β -Untereinheit des Transporters) stellt wie das Conn-Syndrom (primärer Hyperaldosteronismus) eine Ursache für arterielle Hypertonie dar (6, 7, 30, 39, 80, 98, 206, 304, 309).

Auch der epitheliale Kaliumkanal ROMK1 (339), die Na^+/K^+ -ATPase (257), der Na^+/H^+ -Austauscher NHE3 (338), der spannungsabhängige Natriumkanal SCN5A, die spannungsabhängigen Kaliumkanäle KCNE1 bzw. KCNQ1 (72) und Kv1.3 (94, 95, 299) werden von SGK1 aktiviert. SCN5A, KCNQ1 und KCNE1 kommen im Herz vor und sind mit dem Long-QT-Syndrom assoziiert (72). Der in Kapitel 1.3 beschriebene CFTR wird ebenfalls von SGK1 stimuliert; bei der durch einen defekten CFTR hervorgerufenen zystischen Fibrose ist die SGK1-Expression in der Lunge deutlich gesteigert (303).

Die Expressionsrate des Glukosetransporters GLUT1 in der Zellmembran wird durch SGK1 erhöht, diejenige des Transporters GLUT4 von SGK1 und PKB (118, 130, 152, 217, 297).

Über eine Beteiligung an der Regulation von Chlorid- und Kationenleitfähigkeit nimmt die SGK Einfluss auf die Zellvolumenregulation (16, 25, 147).

Eine weitere wesentliche Funktion erfüllt die SGK1 in der Regulation von Zellproliferation und Apoptose (31, 165); sie ist hier in die Vermittlung der antiapoptotischen Glukokortikoidwirkung involviert (190).

SGK1 und ^{T308DS473D}PKB stimulieren den Natrium-gekoppelten Glutamattransporter EAAT3, der in retinalen Ganglionzellen exprimiert wird und dort an der Glutamatreabsorption aus dem synaptischen Spalt beteiligt ist (253). SGK1 ist in verschiedenen retinalen Zellen nachzuweisen und ist in Ganglionzellen mit EAAT3 kolokalisiert. Die Oberflächenexpression des glialen Glutamattransporters EAAT1, der in einer großen Anzahl weiterer Gewebe zu finden ist, wird von IGF-I, ^{S422D}SGK1, SGK3 und ^{T308DS473D}PKB vermutlich über die oben beschriebene Signalkaskade einschließlich IGF-I und Phosphatidylinositol-3-Kinase aktiviert (26). Es ist bekannt, dass die SGK1-Expression bei Verletzung von Neuronen stimuliert wird; eventuell führt die Aktivierung von EAAT1 zu einer Reduktion der Neurotoxizität (125).

1.5 Bedeutung der Ubiquitinligase Nedd4-2 sowie Interaktion von Nedd4-2 mit SGK

Die Ubiquitinligase Nedd4-2 (*Neuronal developmentally downregulated Gene 4, Isoform 2*) spielt eine wesentliche Rolle beim Proteinabbau in Zellen. Sie katalysiert die Bindung von Ubiquitin („Ubiquitinierung“) an Proteine im Zytoplasma oder in der Zellmembran, so dass diese für den Abbau bzw. die Endozytose markiert sind (225).

Nedd4-2 weist eine C2-Domäne, 3 (bei Ratten und Mäusen) oder 4 (beim Menschen und bei *Xenopus*) WW-Domänen und eine Ubiquitinligase-Hect-Domäne auf (153, 244, 273). Die C2-Domäne ist am Membran-Targeting beteiligt (227, 228); die WW-Domänen sind erforderlich für Protein-Protein-Interaktionen sowie für die Substraterkennung (28); die Hect-Domäne schließlich liefert die katalytische Ubiquitinligase-Aktivität (124), die für die Ubiquitinierung der Zielproteine verantwortlich ist. Bindungsstelle am abzubauenen Protein sind Prolin-reiche Aminosäuresequenzen wie z. B. das sogenannte PY-Motiv (Pro-Pro-Xxx-Tyr), aber auch folgende Aminosäuresequenzen: Pro-Pro-Leu-Pro, Pro-Xxx-Pro-Pro-Tyr, pSer/pThr (8, 132, 138). Beim epithelialen Natriumkanal ENaC z. B. ist ein solches PY-Motiv bekannt, an welches Ubiquitin mittels Nedd4-2 gebunden werden kann, so dass ENaC durch nachfolgenden Proteinabbau herunterreguliert wird (274, 275). Nedd4-2 selbst wird durch die SGK an Serin (Position 338 und 444) phosphoryliert und dadurch inaktiviert (61), Bindungsstelle hierfür ist ein PY-Motiv in der Aminosäuresequenz der SGK. Die Anzahl der ENaC-Moleküle in der Zellmembran wird so indirekt über eine Inaktivierung von Nedd4-2 durch die SGK erhöht (7, 25, 39, 159, 161, 206, 222, 259, 303, 309). Die Interaktion zwischen Nedd4-2 und ENaC findet zwischen den WW-Domänen von Nedd4-2 und den PY-Motiven von ENaC statt (115, 273). Auch der in Kapitel 1.4 erwähnte Glutamattransporter EAAT1 scheint neben einer direkten Phosphorylierung durch die SGK über einen solchen indirekten Effekt von der SGK stimuliert zu werden (26). Möglicherweise wird Nedd4-2 durch Phosphorylierung mittels SGK nicht vollständig gehemmt, was als Erklärung für

die z. B. bei EAAT1 beobachtete unvollständige Aufhebung des inhibitorischen Nedd4-2-Effekts durch die SGK dienen könnte (26). Mit Hilfe von *Western-Blot*-Analysen konnte gezeigt werden, dass neben SGK1 auch SGK3 (im Gegensatz zu SGK2) in der Lage ist, Nedd4-2 zu phosphorylieren (Abb. 5). Auch PKB ist befähigt, Nedd4-2 zu hemmen, jedoch ist PKB wahrscheinlich weniger wirkungsvoll als SGK1 (26).

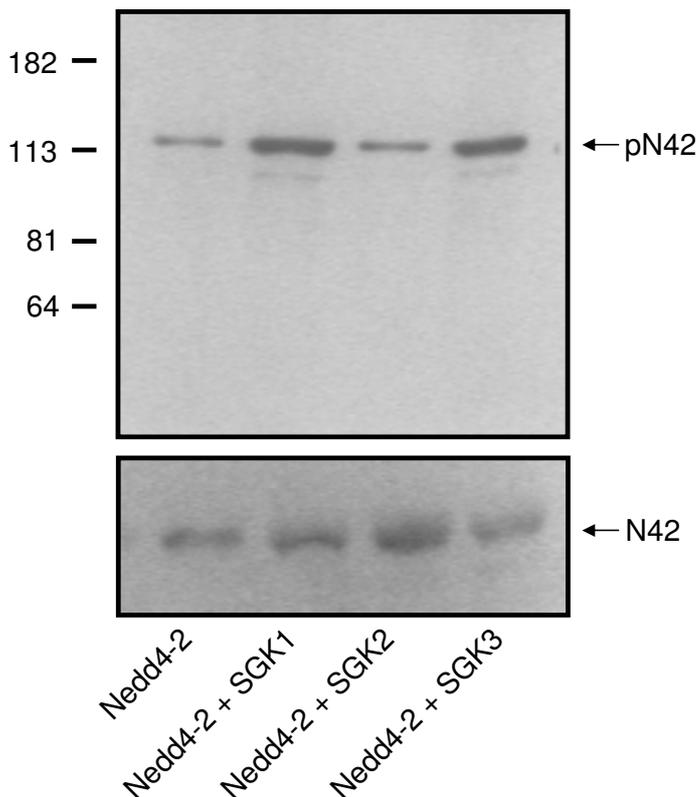


Abb. 5: Immunoblotting mit Anti-P-Ser328-Nedd4-2-Antikörper (pN42) und Anti-Nedd4-2-Antikörper (N42). *Western Blot* von Oozyten, die Nedd4-2 allein oder in Kombination mit SGK1, SGK2 bzw. SGK3 exprimierten, zeigt, dass SGK1 und SGK3 im Gegensatz zu SGK2 in der Lage sind, Nedd4-2 zu phosphorylieren (216).

Nedd4-2 und SGK1 sind im apikalen Bereich von Enterozyten menschlicher Dünndarmvilli kolokalisiert (Abb. 6). In *Xenopus*-Oozyten wurde endogenes Nedd4-2 nachgewiesen, das die Stimulation durch die SGK ohne Expression zusätzlicher exogener Nedd4-2-Moleküle bei Transportern bzw. Kanälen erklären könnte, die keine SGK-Phosphorylierungsstelle aufweisen (61).

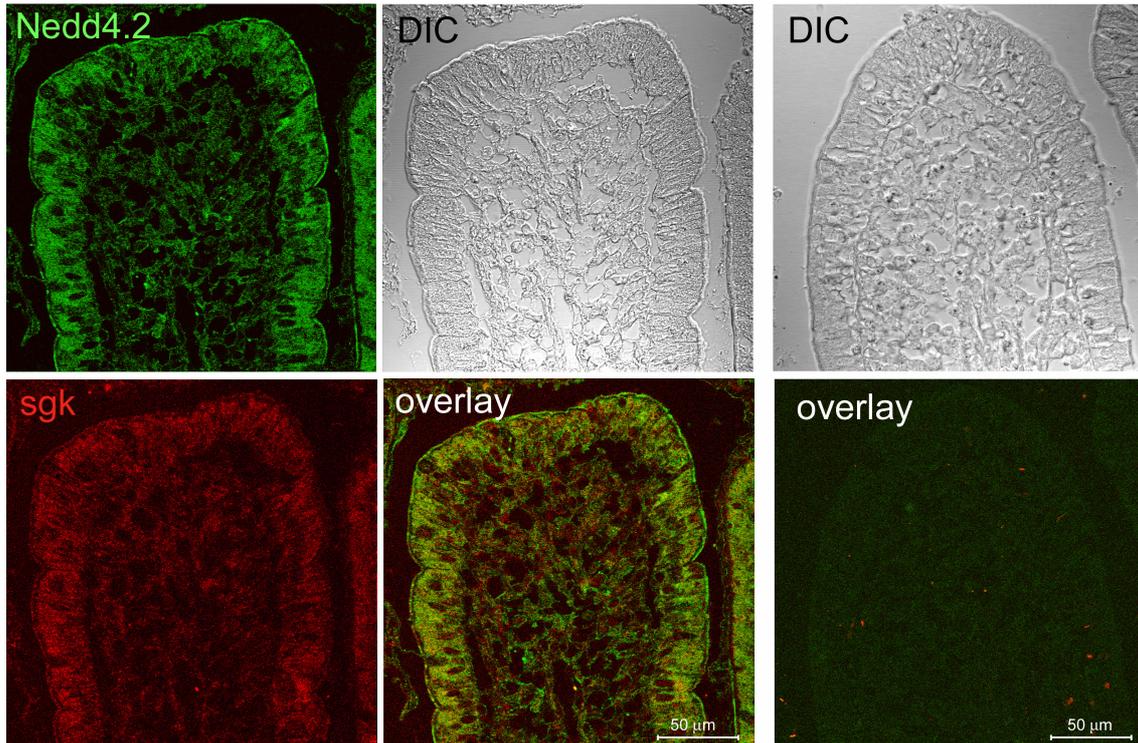


Abb. 6: Immunoreaktivität von Nedd4-2 und SGK1 in Gewebeschnitten menschlichen Dünndarms. SGK1-Protein wird in menschlichen Enterozyten vorwiegend dicht an der apikalen Membran exprimiert und ist hier mit Nedd4-2 kolokalisiert. DIC: differentieller Interferenz-Kontrast (216).

In der vorliegenden Arbeit wurden neben Wildtyp-Nedd4-2 (61) auch die katalytisch inaktive Ligase ^{C938S}Nedd4-2 (63, 215) sowie die ^{S338AS444A}Nedd4-2-Mutante, der die SGK-Phosphorylierungsstelle fehlt, verwendet (63).

1.6 *Xenopus-laevis*-Oozyten als Expressionssystem

Oozyten verschiedener Spezies sind in der Lage, nach Injektion exogener mRNA die entsprechenden Proteine zu exprimieren (59, 101). Hierdurch ließen sich in den letzten Jahren in Expressionsklonierungsstudien und elektrophysiologischen Studien zahlreiche Transporter bzw. Ionenkanäle genauer charakterisieren (14, 282). Das gebräuchlichste Expressionssystem stellen die Oozyten von *Xenopus laevis*, dem südafrikanischen Krallenfrosch, dar.

Xenopus-laevis-Frösche fanden vor wenigen Jahrzehnten Verwendung im Rahmen von Schwangerschaftstests (103), indem weiblichen Fröschen der Urin potenziell schwangerer Frauen injiziert wurde; das im Urin schwangerer Frauen enthaltene HCG löst bei den Fröschen die Eiablage aus. *Xenopus-laevis*-Frösche sind Aerobier, die allerdings nur im Wasser leben (102). Sie können mit relativ geringem Aufwand im Labor in Aquarien gehalten werden. Der recht große Zelldurchmesser der Oozyten von ca. 1,3 mm ermöglicht eine vergleichsweise einfache Handhabung bei Oozytenpräparation, Sortieren, Inkubation sowie cRNA-Injektion und Versuchsdurchführung mit Hilfe intrazellulärer Glaskapillaren (267, 302).

Bereits in den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde gezeigt, dass Oozyten in der Lage sind, durch Injektion ins Zytoplasma eingebrachte RNA zu exprimieren (101); der zur weiteren embryonalen Entwicklung angelegte Vorrat an Proteinen, Enzymen und Organellen in den Oozyten kann zur Expression exogen zugeführter RNA genutzt werden. Für viele spannungsgesteuerte Ionenkanäle und Neurotransmitterrezeptoren konnte bisher nachgewiesen werden, dass sie in *Xenopus*-Oozyten korrekt exprimiert werden (56); auch posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierungen und Phosphorylierungen exogener Proteine werden zumeist korrekt ausgeführt; allerdings existieren auch Nachweise für inkorrekte posttranslationale Modifikationen (269, vgl. auch Kapitel 4).

Nach Dumont werden 6 Reifestadien der Oozyten unterschieden (67); für Expressionsstudien werden meist nur Oozyten der Stadien V und VI verwendet. *Xenopus-laevis*-Oozyten sind von außen nach innen von folgenden Zellschichten umgeben: Epithelschicht – Theka – Follikelzellschicht – Vitellinmembran. Durch die Behandlung mit Kollagenase (vgl. Kapitel 2) werden alle Schichten bis auf die innere Vitellinmembran entfernt. Durch diese Defollikulierung entstehen in der Membran kleinere Defekte, die unspezifische Ionenkanäle imitieren können, sich nach Stunden bis Tagen aber gewöhnlich wieder verschließen (242). Bereits äußerlich lässt sich eine Zweiteilung der Oozyten in eine durch Melanineinlagerungen dunkel gefärbte animalische Hemisphäre sowie eine helle vegetative Hemisphäre erkennen. Diese Polarität

setzt sich intrazellulär fort: Die vegetative Hemisphäre enthält mehr RNA und besitzt eine ausgeprägtere laterale Membranmotilität; in der animalischen Hemisphäre sind der Zellkern sowie ein Großteil des Zytoskeletts, des endoplasmatischen Retikulums und der Mikrovilli lokalisiert, hier ist auch die Dichte Kalzium-abhängiger Chloridkanäle größer; die animalische Seite ist zudem Eintrittsort des Spermiums (56, 267).

Die gemessenen intrazellulären Ionenkonzentrationen variieren stark bei verschiedenen Oozyten; so wurden für Natrium Konzentrationen von 2 – 18 mmol/l gemessen (bei den meisten Oozyten vermutlich ~5 – 6 mmol/l), die Kaliumkonzentration liegt bei 110 – 130 mmol/l, die Kalziumkonzentration bei 0,1 – 0,4 µmol/l und die Chloridkonzentration bei 40 – 50 mmol/l (56).

1.7 Fragestellung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte mit Hilfe elektrophysiologischer Untersuchungen an *Xenopus-laevis*-Oozyten die Wirkung der Ubiquitinligase Nedd4-2 und der Serum- und Glukokortikoid-induzierbaren Kinase SGK1 auf den Natrium-Glukose-Kotransporter SGLT1, auf den anorganischen Phosphattransporter NaPi IIb sowie auf den Chloridkanal CIC-2 untersucht werden.

Ferner sollte die Beeinflussung der Aktivität von SGLT1, NaPi IIb und CIC-2 durch die mit SGK1 verwandten Kinasen SGK2 und SGK3 näher betrachtet werden.

Schließlich sollte der Einfluss der konstitutiv aktiven SGK1-Mutante ^{S422D}SGK1, der inaktiven SGK1-Mutante ^{K127N}SGK1, der konstitutiv aktiven PKB-Mutante ^{T308DS473D}PKB, der inaktiven PKB-Mutante ^{T308AS473A}PKB und der Nedd4-2-Mutanten ^{C938S}Nedd4-2 und ^{S338AS444A}Nedd4-2 auf SGLT1, NaPi IIb bzw. CIC-2 charakterisiert werden.

Die Ergebnisse dieser Dissertation wurden in den unter Kapitel 7 angegebenen Fachzeitschriften publiziert.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Lösungen und Substanzen

ND 96-Lösung

ND 96 war die Basislösung für alle Versuche und für die Oozytenpräparation (Tab. 1).

Substanz	Konzentration
NaCl	96 mmol/l
KCl	2 mmol/l
CaCl ₂	1,8 mmol/l
MgCl ₂	1 mmol/l
Tris-HEPES	5 mmol/l

Tab. 1: Zusammensetzung der ND 96-Lösung, pH 7,4.

Tris-HEPES (Tris-N-(Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure), pK_s 7,4) diene als Puffer-Substanz.

ND 96-Oozytenaufbewahrungslösung

Substanz	Konzentration
NaCl	96 mmol/l
KCl	2 mmol/l
CaCl ₂	1,8 mmol/l
MgCl ₂	1 mmol/l
Tris-HEPES	5 mmol/l
Natriumpyruvat	2,5 mmol/l
Theophyllin	0,5 mmol/l
Gentamicin	50 µg/l

Tab. 2: Zusammensetzung der ND 96-Oozytenaufbewahrungslösung, pH 7,4.

Theophyllin (Tab. 2) hemmt über eine Verminderung der Proteinbiosynthese und durch Veränderungen der Zellmembran die weitere Reifung der Oozyten

(210), Gentamicin sollte bakterielle Infektionen während der Inkubation verhindern.

OR-2-Lösung

Substanz	Konzentration
NaCl	82,5 mmol/l
KCl	2 mmol/l
MgCl ₂	1 mmol/l
Tris-HEPES	5 mmol/l

Tab. 3: OR-2-Lösung, pH 7,4.

OR-2-Lösung (Tab. 3) wurde für die Kollagenasebehandlung der Oozyten eingesetzt. Sie ist im Gegensatz zur ND 96-Lösung kalziumfrei, da durch Kalzium Proteasen aktiviert werden, welche die Oozyten während der Defollikulierung schädigen können.

Weitere verwendete Substanzen

- für die Oozytenpräparation:
 - 3-Aminobenzoessäureethylester (Leitungswasser zugesetzt)
0,1 %
 - Kollagenase A (OR-2 zugesetzt)
1 – 3 g/l entsprechend ihrer Aktivität (Boehringer, Mannheim)
- für SGLT1-Messungen (jeweils ND 96 zugesetzt):
 - Glucose 10 mmol/l
 - Phloridzin 1-[2-(β-D-Glucopyranosyloxy)-4,6-dihydroxyphenyl]-3-(4-hydroxyphenyl)-1-propanon
100 μmol/l

- für NaPi IIb-Messungen (ND 96 zugesetzt):
 - Na_2HPO_4 3 mmol/l bzw. für Kinetik-Messungen in ansteigenden Konzentrationen von 1 $\mu\text{mol/l}$, 3 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 30 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$ und 300 $\mu\text{mol/l}$

Alle Substanzen wurden von Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) oder Sigma (München) bezogen. Die verwendeten Lösungen wurden regelmäßig frisch angesetzt, bei 8 °C im Kühlschrank aufbewahrt und bei Zimmertemperatur verwendet. Zur Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 wurde die jeweilige Lösung mit NaOH bzw. HCl titriert. Die Osmolarität der Versuchslösungen betrug jeweils 200 – 220 mosmol/l.

2.2 Oozytenpräparation

Die Oozyten wurden weiblichen *Xenopus-laevis*-Fröschen unter semisterilen Bedingungen entnommen. Zur Narkose wurde ein Frosch für etwa 20 min in 0,1%ige 3-Aminobenzoesäureethylester-Lösung (lauwarmes Leitungswasser) gelegt, bis er vollständig betäubt war. Um eine dauerhafte Anästhesie zu gewährleisten und eventuelle Blutungen zu minimieren, wurde er im Anschluss mit dem Rücken auf Eis gebettet. Nach Desinfektion der Bauchhaut wurde oberhalb der Inguinalfalte ein ca. 0,5 – 1 cm langer Schnitt zur Eröffnung der Peritonealhöhle gesetzt, in der sich die bindegewebigen Ovarialsäckchen befinden. Mit Hilfe anatomischer Pinzetten wurden vorsichtig einzelne Läppchen mobilisiert und entnommen, die Wunde wurde anschließend mit resorbierbarem Nahtmaterial wieder verschlossen. Der Frosch wurde bis zum Ende der Narkose in ein Behältnis mit frischem Leitungswasser gesetzt.

Die entnommenen Ovarialläppchen wurden in kleinere Einheiten separiert und mit ND 96-Lösung gespült. Zur Entfernung der äußeren Bindegewebsschichten wurden die Oozyten für 60 – 120 min in OR-2-Lösung, die mit Kollagenase A versetzt war, unter kontinuierlicher Bewegung inkubiert. Unter der Stereolupe wurde regelmäßig der Zustand der Oozyten kontrolliert. Bei ausreichender

Defollikulierung und Vereinzelung der Zellen wurde die Kollagenasebehandlung gestoppt, indem die Eizellen mehrmals mit ND 96-Lösung gespült wurden. Anschließend wurden unter der Stereolupe Oozyten der Stadien V und VI nach Dumont, deren äußere Form und Membran optisch einwandfrei waren, aussortiert. Bis zur cRNA-Injektion wurden jeweils etwa 30 Zellen für 24 h bei 16 °C in ND 96-Aufbewahrungslösung in Petrischalen inkubiert. Vor Injektion wurden die Zellen erneut sortiert.

2.3 cRNA-Synthese und -Injektion

Die gesamte verwendete cRNA wurde von Birgitta Noll (Physiologisches Institut Tübingen) synthetisiert. Zunächst wurde die entsprechende cDNA durch Transformation in *Escherichia coli*-Bakterien des Stammes DH5 α vermehrt (248). Mittels Minipräparation wurde am darauffolgenden Tag die erfolgreiche Transformation bestätigt und dann durch Maxipräparation die Plasmid-DNA gewonnen. Die Plasmid-DNA wurde an einer Restriktionsstelle am 3'-Ende des Inserts mit dem jeweiligen Restriktionsenzym linearisiert. Nach Aufreinigung wurde die cDNA bei -20 °C gelagert. Die Synthese der cRNA erfolgte durch *In-vitro*-Transkription, die cRNA wurde durch Restriktionsverdau unter Verwendung der entsprechenden Polymerasen hergestellt. Die cRNA wurde bei -80 °C als Stammlösung in Konzentrationen von 1 – 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ aufbewahrt. Wegen der Empfindlichkeit der cRNA gegenüber RNAsen wurde mit Latexhandschuhen gearbeitet und der Arbeitsplatz gründlich desinfiziert. Vgl. Tab. 4 zu den verwendeten cRNA-Klonen und -Mutanten.

Plasmid	Vektor	Resistenz	Restriktions-enzym	RNA-Polymerase
pSGLT1 (h) NaPi IIb CIC-2 rat CIC-2 S82D rat CIC-2 S82A rat	pBluescript pSP64 pTLN pTLN pTLN	Ampicillin Ampicillin Ampicillin Ampicillin Ampicillin	EcoRI Sall BamHI BamHI BamHI	T3 SP6 T7 T7 T7
hSGK WT hSGK S422D P296L hSGK KN pGHJ hSGK2 hSGK3 PKB 308D473D PKB α T308AS473D	pGEM-He-Juel pGEM-He-Juel pGEM-He-Juel pGEM-He-Juel pGEM-He-Juel pGEM-He-Juel pGEM-He-Juel	Ampicillin Ampicillin Ampicillin Ampicillin Ampicillin Ampicillin Ampicillin	Stul Stul Stul Stul/NotI Stul/NotI Sall Sall	T7 T7 T7 T7 T7 T7 T7
Xen. laev. Nedd4-2 (61 kb) Xen. laev. Nedd4-2 C938S S338A S444A Nedd	pSDeasy SB pSDeasy SB pSDeasy SB	Ampicillin Ampicillin Ampicillin	Clal Clal Clal	SP6 SP6 SP6

Tab. 4: Verwendete cRNA-Klone und -Mutanten.

Mittels eines Mikroelektrodenpullers (DMZ-Universal-Puller, Zeitz-Instrumente GmbH, München) wurden aus Borosilikatglaskapillaren (Firma WPI, Sarasota, USA) mit einem Außendurchmesser von 1,2 mm Injektionskapillaren mit sehr langer Spitze gezogen. Diese Spitze wurde unter dem Stereomikroskop abgebrochen, um einen Öffnungsdurchmesser der Kapillare von ungefähr 20 – 40 μm zu erlangen. Anschließend wurde die Kapillare mit Paraffinöl gefüllt, um eine optimale Abdichtung zum Metallkolben des Mikroinjektors zu erreichen. Nach dem Auftauen der jeweiligen cRNA wurde diese in die Injektionskapillare aufgezogen. Mit Hilfe des Mikroinjektors (Firma WPI, Sarasota, USA) wurden jeweils 25 nl pro Oozyte unter dem Stereomikroskop injiziert. Um den Zellen Zeit zur Regeneration zu geben, wurde am ersten Tag lediglich die cRNA der Kinasen bzw. von Nedd4-2 injiziert und erst am folgenden Tag die cRNA der jeweiligen Transporter bzw. Kanäle. Kontrollzellen wurden mit DEPC-behandeltem und autoklaviertem Wasser injiziert, um injektionsbedingte Unterschiede im Zellvolumen sowie Zellalterationen durch den

Elektrodeneinstich bei den einzelnen Zellgruppen zu minimieren. DEPC (Diethylpyrocarbonat) modifiziert Histidinreste in Proteinen zu N-Carboxyhistidin und bewirkt dadurch u. a. eine Hemmung von Enzymen; durch Autoklavieren wird DEPC inaktiviert. Vgl. Tab. 5 zu den injizierten Konzentrationen der entsprechenden cRNA.

cRNA	Konzentration (ng/Oozyte)
SGLT1	2,5
NaPi IIb	30
CIC-2	7,5
S82D CIC-2	7,5
S82A CIC-2	7,5
SGK1	7,5
S422D SGK1	7,5
K127N SGK1	7,5
SGK2	7,5
SGK3	7,5
T308DS473D PKB	7,5
T308AS473A PKB	7,5
Nedd4-2	15
C938S Nedd	15
S338AS444A Nedd4-2	15

Tab. 5: Konzentrationen der verwendeten cRNA.

2.4 Elektrophysiologie: Zwei-Elektroden-*Voltage-Clamp*-Methode

Bei der Zwei-Elektroden-*Voltage-Clamp*-Methode wird die Oozyte auf ein vorgegebenes Membranpotenzial (in der vorliegenden Arbeit -60 mV) „geklemmt“ (266, 272, Abb. 7). Hierfür wurde die Zelle mit zwei Borosilkatglaskapillaren (Harvard Apparatus LTD, Edenbrigde, UK; Außendurchmesser 1,5 mm, Innendurchmesser 1,17 mm, Typ GCI50TF-7,5) angestochen. Diesen Mikroelektroden waren zuvor mit dem Mikroelektrodenpuller Spitzen gezogen worden, so dass deren Widerstand nach Befüllen mit 3 M KCl-Lösung 0,4 – 1,2 MΩ betrug. Die Elektroden wurden über einen chloridierten Silberdraht mit dem Millivoltmeter (HS-2A-Headstage, Axon Instruments, Foster City, California, USA) verbunden.

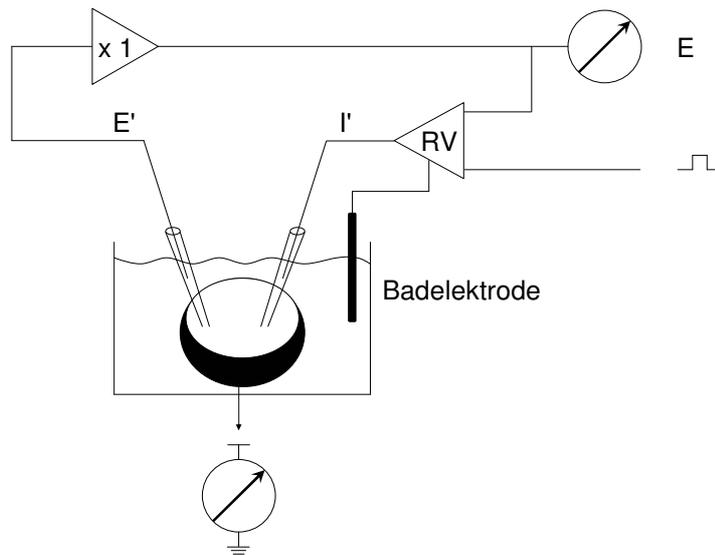


Abb. 7: Zwei-Elektroden-*Voltage-Clamp*. E: Membranpotenzial; RV: Rückkopplungsverstärker; E': intrazelluläre Mikroelektrode, über die das Membranpotenzial E gemessen wird; I': intrazelluläre Mikroelektrode, über die der zur Aufrechterhaltung des vorgegebenen Membranpotenzials erforderliche Strom I appliziert wird (119).

Über die erste intrazelluläre Mikroelektrode E' wird das Membranpotenzial E gemessen und im Rückkopplungsverstärker (Gene Clamp 500B, Axon Instruments, Foster City, California, USA) mit dem vorgegebenen Wert verglichen. Mit der zweiten Elektrode I' wird vom Rückkopplungsverstärker der Strom I appliziert, der nötig ist, um das vorgegebene Membranpotenzial aufrecht zu erhalten. Wird über die Membran eine elektrogene Substanz wie z. B. Na^+ transportiert, so ändert sich der Betrag des zur Aufrechterhaltung des vorgegebenen Membranpotenzials nötigen Stroms. Der Betrag dieses Stroms entspricht dem durch den Transporter bzw. Kanal fließenden Strom über die Zellmembran. Durch die hohe Expressionsrate des jeweiligen Transporters bzw. Kanals wird praktisch nur der Strom dieses zu untersuchenden Proteins gemessen (64, 119).

Die Daten wurden mit 10 Hz gefiltert und über einen DA-Wandler (Digidata 1322 A, Axon Instruments, Foster City, California, USA) mittels der Software *Chart* (Version 3.5.7, ADInstruments, Colorado Springs, Colorado, USA) aufgezeichnet. Um die Messungen vor Störeinflüssen durch andere elektrische

Geräte zu schützen, war der gesamte Versuchsaufbau von einem Faraday-Käfig umgeben (211).

2.5 Durchführung der Experimente

Alle Experimente erfolgten 3 bis 4 Tage nach cRNA-Injektion bei Zimmertemperatur (19 – 21 °C). Die jeweiligen Versuche wurden an mindestens drei, von verschiedenen Fröschen stammenden Oozytenpräparationen durchgeführt. Die zu untersuchende Oozyte wurde während des gesamten Versuchs in der Messkammer von ND 96-Lösung mit einer Flussgeschwindigkeit von 20 ml/min umspült; innerhalb von ungefähr 10 s wurde dadurch ein kompletter Austausch der Badlösung erreicht. Es wurden nur Zellen verwendet, deren Ruhemembranpotenzial mindestens -20 mV betrug. Nach dem Anstechen der Zelle wurde einige Zeit zugewartet, bis sich die Zelle stabilisiert hatte, was am negativer werdenden und schließlich konstanten Ruhemembranpotenzial zu erkennen war. Bei allen Versuchen betrug das Haltepotenzial -60 mV.

Zur Untersuchung SGLT1-exprimierender Oozyten wurde ND 96-Lösung mit Glukose (10 mmol/l) versetzt, die einen zu messenden Einwärtsstrom bewirkte (Abb. 8). Entsprechend wurde bei NaPi IIb-cRNA-injizierten Zellen der durch 3 mM Na₂HPO₄ induzierte Strom gemessen.

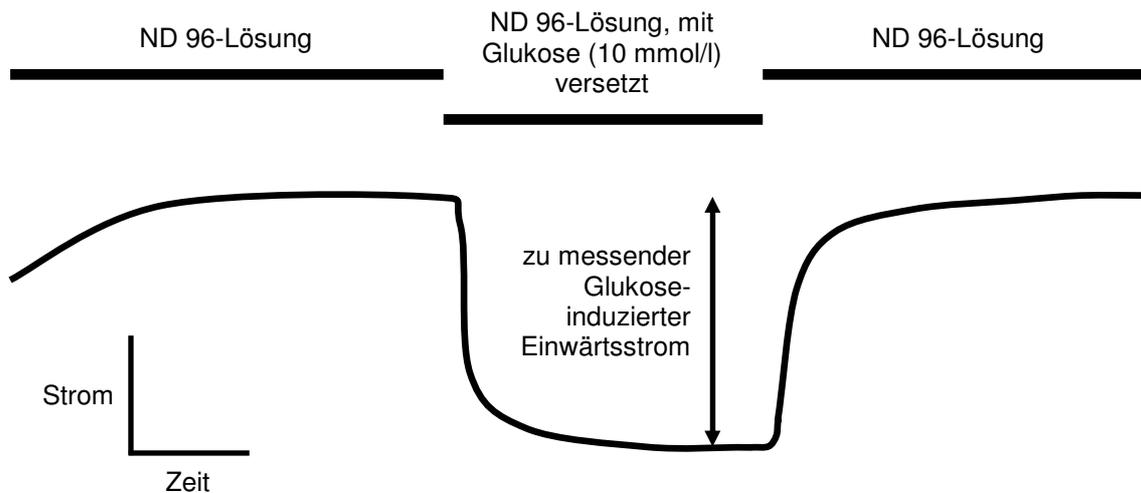


Abb. 8: Beispielhafte schematische Darstellung der Versuchsdurchführung anhand einer SGLT1-exprimierenden Oozyte. Eine SGLT1-exprimierende Oozyte wird nach dem Anstechen mit den Mikroelektroden so lange mit ND 96-Lösung perfundiert, bis sich das Ruhemembranpotenzial stabilisiert hat. Perfusion mit 10 mM Glukose-ND 96-Lösung bewirkt einen Glukose-induzierten Einwärtsstrom, dessen Betrag gemessen wird. Nach Ausspülen der Glukose-ND 96-Lösung mit reiner ND 96-Lösung wird wieder das Ruhemembranpotenzial erreicht.

Der Chloridkanal ClC-2 wurde mittels eines Pulsprotokolls (Spannungsrampe von -140 mV bis +40 mV in 20 mV-Schritten mit einer Dauer von jeweils 10 s) untersucht. Das zwischen den einzelnen Spannungspulsen liegende Haltepotenzial betrug -60 mV. Zur statistischen Auswertung wurden die Ströme am Ende des Pulses bei -120 mV gemessen.

2.6 Auswertung und Statistik

Alle Werte sind als arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM, *Standard Error of the Mean*) angegeben. „n“ gibt die Anzahl der gemessenen Oozyten an. Alle Versuchsreihen wurden mindestens dreimal durchgeführt, wobei die Oozyten jeweils von verschiedenen Fröschen stammten. Bei quantitativ stark voneinander abweichenden Ergebnissen wurden die Werte normalisiert und als Prozentwerte bezogen auf die nur mit der jeweiligen Transporter- bzw. Kanal-cRNA und H₂O injizierten Oozyten angegeben; Voraussetzung hierfür war, dass sich keine qualitativen

Unterschiede gezeigt hatten. Beim Vergleich der Mittelwerte zweier Gruppen wurde zur Prüfung der Signifikanz der ungepaarte zweiseitige *Student's t-Test* verwendet. Mit Hilfe des *ANOVA-Tests* wurden die Ergebnisse beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen mit einer Kontrollgruppe auf Signifikanz geprüft. Werte mit $p < 0,05$ sind als signifikant angegeben und in den Abbildungen mit * bzw. # gekennzeichnet.

Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden mit der Michaelis-Menten-Gleichung berechnet (256):

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

Dabei ist I der gemessene Strom, I_{\max} der maximale Strom, C die gegebene Substratkonzentration und K_m die Substratkonzentration bei halbmaximalem Strom (256).

3 Versuche und Ergebnisse

3.1 SGLT1

3.1.1 Inhibition von SGLT1 durch Nedd4-2

Zur Untersuchung des Natrium-Glukose-Kotransporters SGLT1 wurden *Xenopus-laevis*-Oozyten mit humaner SGLT1-cRNA injiziert und mit DEPC-Wasser-injizierten Oozyten verglichen, indem der Einwärtsstrom bei Perfusion mit 10 mM Glukose-ND 96-Lösung gemessen wurde. Bei SGLT1-cRNA-injizierten Oozyten betrug der Strom $48,6 \pm 11,5$ nA ($n = 18$) im Vergleich zu $1,3 \pm 0,7$ nA ($n = 6$) bei Wasser-injizierten Zellen. Um nachzuweisen, dass nur SGLT1-Ströme gemessen wurden, wurde der Glukose-ND 96-Lösung der spezifische SGLT1-Inhibitor Phloridzin zugegeben. Dieser bewirkte eine komplette Hemmung des Glukose-induzierten Stromes (Abb. 9).

SGLT1 + H₂O

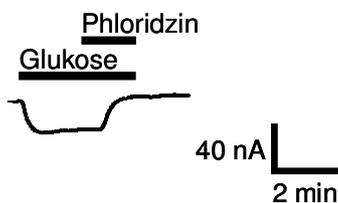


Abb. 9: Vollständige Hemmung von SGLT1 durch Phloridzin (100 μ mol/l). Originalaufzeichnung einer mit SGLT1-cRNA und H₂O injizierten Oozyte. $n = 6$.

Koexpression der Ubiquitinligase Nedd4-2 mit SGLT1 erniedrigte den Einwärtsstrom signifikant auf $49,2 \pm 6,8$ % ($n = 15$) der mit SGLT1-cRNA und Wasser injizierten Zellen (Abb. 10).

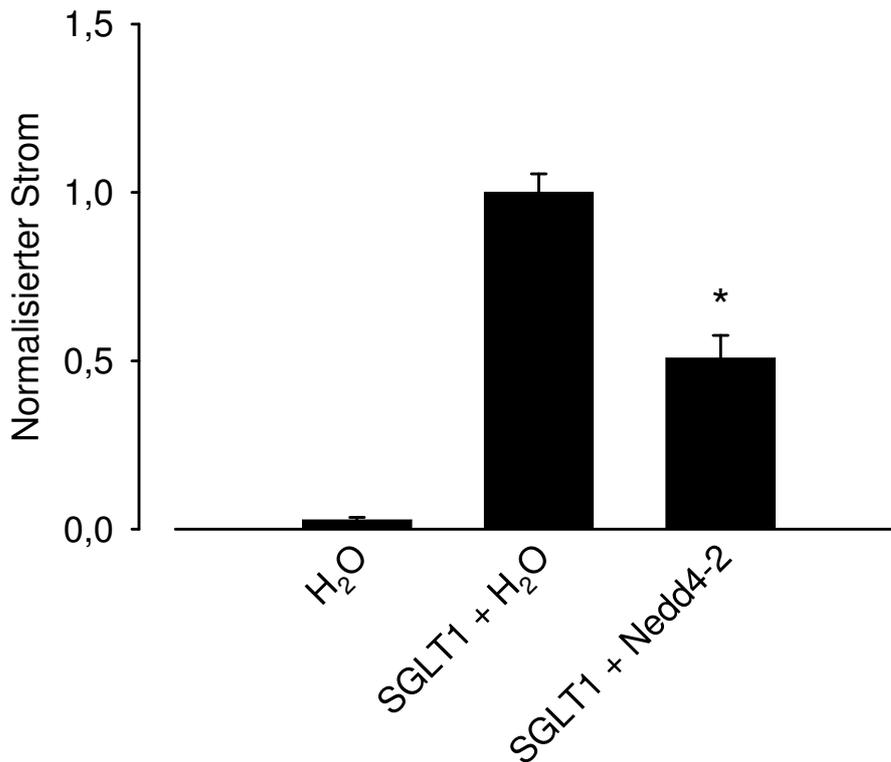


Abb. 10: Expression von SGLT1 in *Xenopus-laevis*-Oozyten und dessen Regulation durch Nedd4-2. Koexpression von Nedd4-2 mit SGLT1 bewirkte eine signifikante Reduktion des Glukose-induzierten Einwärtsstroms verglichen mit SGLT1-cRNA+H₂O-injizierten Zellen. Angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler. * signifikanter Unterschied zu SGLT1-cRNA+H₂O-injizierten Zellen. n = 6 – 15.

3.1.2 Stimulation von SGLT1 durch SGK1

Koexpression des Wildtyps der Serum- und Glukokortikoid-induzierbaren Kinase SGK1 mit SGLT1 steigerte den Glukose-induzierten Strom um $81,3 \pm 19,0 \%$ (n = 15) und hob den Effekt von Nedd4-2 vollständig auf, wenn Nedd4-2 zusammen mit SGK1 exprimiert wurde (Abb. 11). Hier ergab sich ein arithmetischer Mittelwert, der um $34,8 \pm 11,8 \%$ (n = 14) höher lag als der Wert bei nur SGLT1 exprimierenden Oozyten.

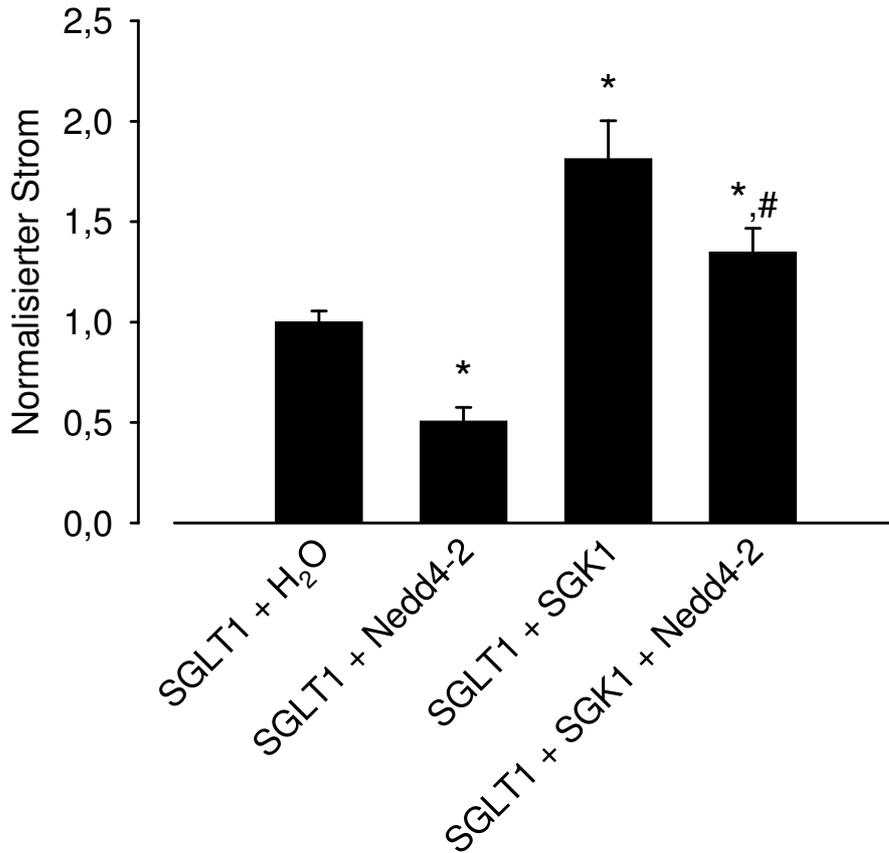


Abb. 11: Koexpression von SGK1 mit SGLT1 führte zu einer signifikanten Zunahme des Glukose-induzierten Stroms. Die inhibitorische Wirkung von Nedd4-2 ließ sich durch SGK1 vollständig aufheben. Angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler. * signifikanter Unterschied zu SGLT1-cRNA+H₂O-injizierten Zellen. # signifikanter Unterschied zu SGLT1+Nedd4-2-exprimierenden Zellen. n = 14 – 15.

Auch bei Stimulation von SGLT1 durch SGK1 wurde der Glukose-induzierte Strom durch den SGLT1-Inhibitor Phloridzin vollständig gehemmt (n = 8, Abb. 12; vgl. auch Abb. 9).

SGLT1 + SGK1

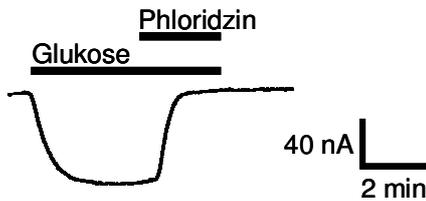


Abb. 12: Komplette Hemmung des Glukose-induzierten Stroms auch bei Stimulation von SGLT1 durch SGK1. Originalaufzeichnung einer SGLT1- und SGK1-cRNA-koinjizierten Oozyte. n = 8. Vgl. auch Abb. 9.

3.1.3 Wirkung der Mutanten ^{C938S}Nedd4-2 und ^{S338AS444A}Nedd4-2 auf SGLT1

Um zu zeigen, dass die Reduktion des Glukose-induzierten Stroms durch Wildtyp-Nedd4-2 nicht auf einer Überlastung der Proteinbiosynthese allein infolge einer Koinjektion von SGLT1- und Nedd4-2-cRNA beruhte, wurde statt der Wildtyp-Nedd4-2-cRNA cRNA der katalytisch inaktiven Ligase ^{C938S}Nedd4-2 in Oozyten injiziert.

Hier konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zu nur SGLT1 exprimierenden Oozyten festgestellt werden ($100,0 \pm 11,1$ % des SGLT1+H₂O-Wertes, n = 21). Folglich wurde SGLT1 durch die katalytische Aktivität der Wildtyp-Ubiquitinligase Nedd4-2 herunterreguliert (Abb. 13).

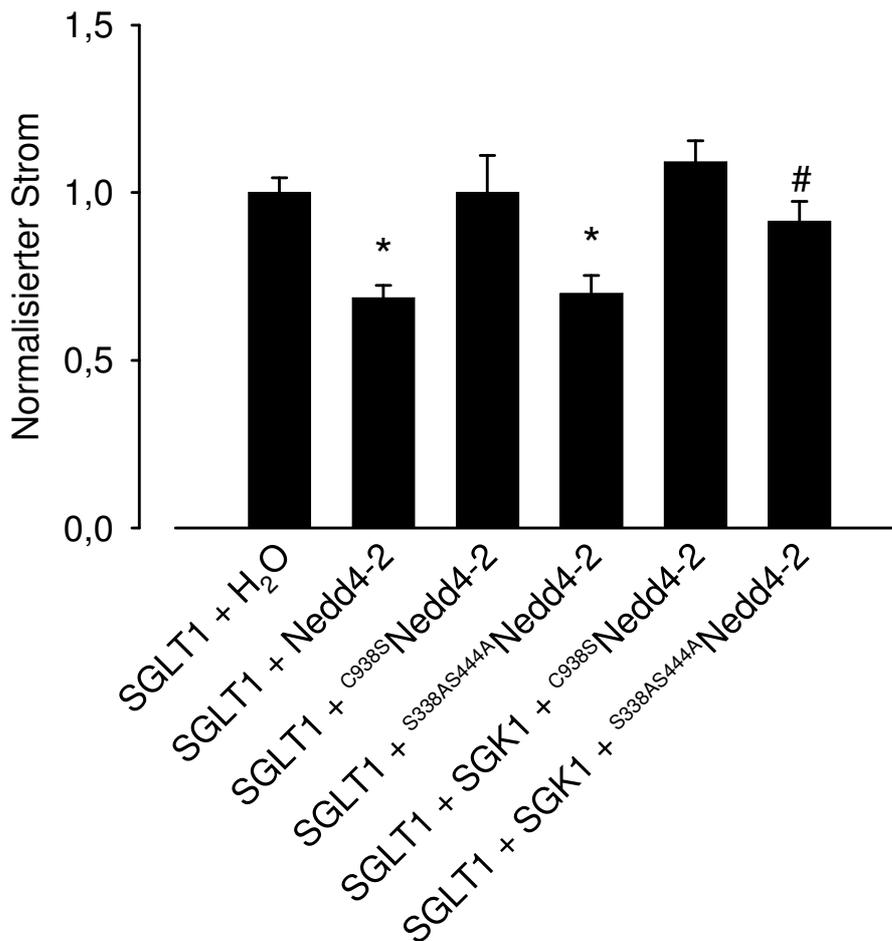


Abb. 13: Wirkung der ^{S338AS444A}Nedd4-2-Mutante auf SGLT1. Sie senkte den Glukose-induzierten Strom auf $70,0 \pm 5,3 \%$, Wildtyp-Nedd4-2 auf $68,7 \pm 3,7 \%$ des Wertes von SGLT1+H₂O. SGK1 konnte die Wirkung der ^{S338AS444A}Nedd4-2-Mutante nur teilweise aufheben. Die inaktive Nedd4-2-Mutante ^{C938S}Nedd4-2 zeigte keinen signifikanten Effekt. Angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler. * signifikanter Unterschied zu SGLT1-cRNA+H₂O-injizierten Zellen. # signifikanter Unterschied zu SGLT1+^{S338AS444A}Nedd4-2-exprimierenden Zellen. n = 19 – 22.

In derselben Versuchsreihe wurde die Wirkung der ^{S338AS444A}Nedd4-2-Ligase auf SGLT1 untersucht. ^{S338AS444A}Nedd4-2 ist eine Mutante, der die SGK-Phosphorylierungsstelle fehlt; eine Inaktivierung durch SGK ist daher nicht möglich. Sie erwies sich als ähnlich wirksam wie Wildtyp-Nedd4-2 und senkte den Glukose-induzierten Strom auf $70,0 \pm 5,3 \%$ (n = 21, Abb. 13) des SGLT1+H₂O-Wertes. Die Wirkung der ^{S338AS444A}Nedd4-2-Mutante auf SGLT1 konnte durch Koexpression mit SGK1 nur wenig abgeschwächt werden auf $91,5 \pm 6,0 \%$ (n = 21) des SGLT1+H₂O-Wertes (Abb. 13).

3.1.4 Wirkung der SGK-Mutanten ^{S422D}SGK1 und ^{K127N}SGK1 auf SGLT1

Durch Austausch des Serins an Position 422 durch Aspartat entsteht die konstitutiv aktive Kinase ^{S422D}SGK1. Sie zeigte eine ähnliche Wirkung wie die Wildtyp-SGK1. Bei Koexpression mit SGLT1 erhöhte sie den Glukose-induzierten Strom um $72,4 \pm 9,1$ % (n = 57, Abb. 14) und konnte des Weiteren den Effekt von Nedd4-2 vollständig hemmen, sogar höhere Ströme erzielen als in nur SGLT1 exprimierenden Oozyten (Zunahme um $59,2 \pm 19,8$ %, n = 16).

Die inaktive SGK-Mutante ^{K127N}SGK1 hingegen zeigte keinen signifikanten Einfluss auf SGLT1 ($-2,0 \pm 5,3$ %, n = 14). Die Nedd4-2-Wirkung auf SGLT1 konnte durch ^{K127N}SGK1 nicht verringert werden, der Glukose-induzierte Strom betrug bei Koexpression von Nedd4-2 und ^{K127N}SGK1 $45,1 \pm 9,7$ % (n = 8) des Kontrollwertes.

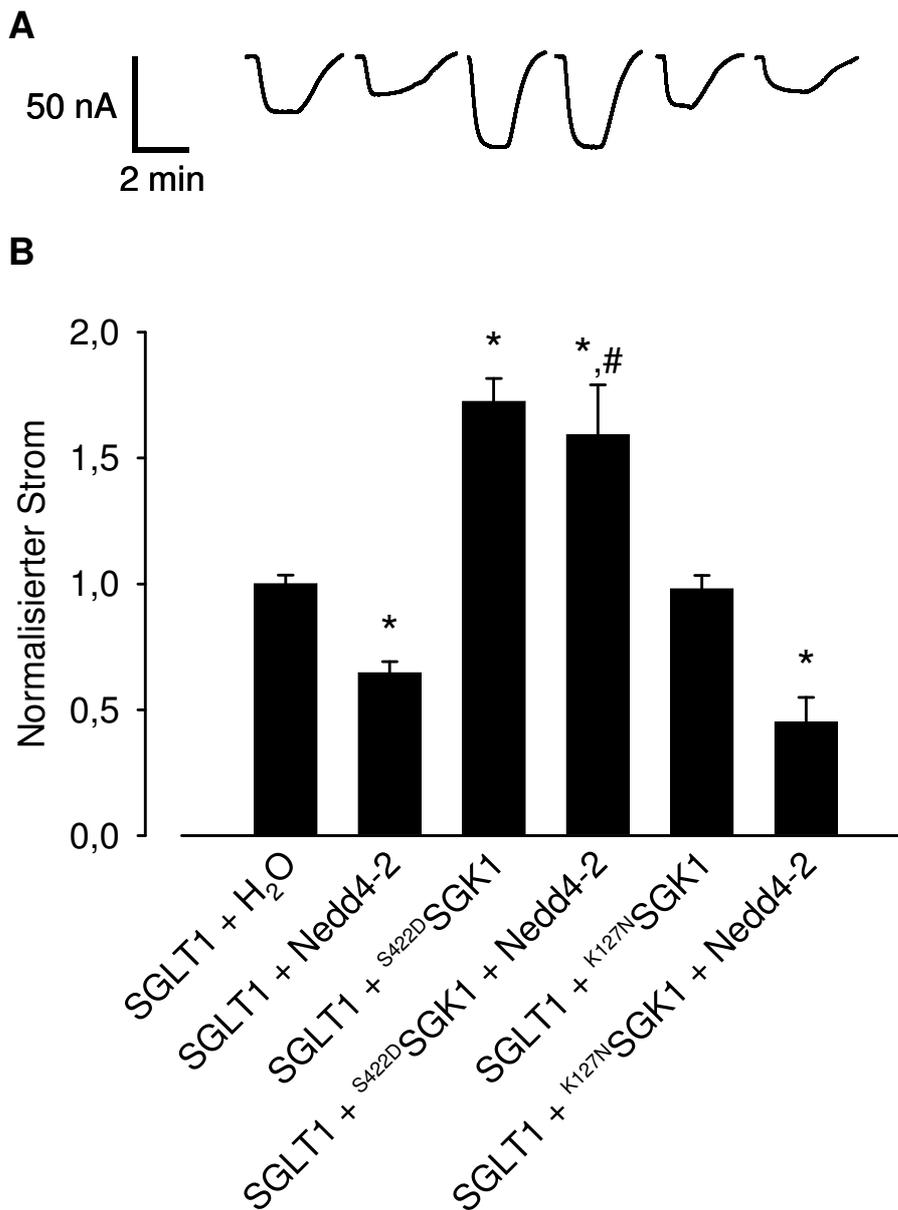


Abb. 14: Wirkung der Mutanten ^{S422D}SGK1 und ^{K127N}SGK1 auf SGLT1. Die konstitutiv aktive Kinase ^{S422D}SGK1 erhöhte den Glukose-induzierten Strom und inaktivierte die Nedd4-2-Wirkung. Die inaktive Kinase ^{K127N}SGK1 zeigte keinen Effekt auf SGLT1. **A** Originalaufzeichnungen von Oozyten nach Perfusion mit 10 mM Glukose-ND 96-Lösung. **B** arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler. * signifikanter Unterschied zu SGLT1-cRNA+H₂O-injizierten Zellen. # signifikanter Unterschied zu SGLT1+Nedd4-2-exprimierenden Zellen. n = 8 – 57.

3.1.5 Wirkung der Kinasen SGK2, SGK3 sowie ^{T308DS473D}PKB auf SGLT1

In der nachfolgenden Versuchsreihe wurde die Funktion der mit SGK1 eng verwandten Kinasen SGK2, SGK3 und ^{T308DS473D}PKB (konstitutiv aktive Form der Wildtyp-PKB) untersucht. Es zeigte sich, dass SGK3 und ^{T308DS473D}PKB eine ähnlich stimulierende Wirkung aufwiesen wie SGK1 (Abb. 15). SGK3 erhöhte den Glukose-induzierten Strom im Vergleich zu SGLT1-cRNA+H₂O-injizierten Oozyten um $123,6 \pm 15,0$ % (n = 22), ^{T308DS473D}PKB um $117,4 \pm 15,8$ % (n = 31). Die inaktive PKB-Mutante ^{T308AS473A}PKB senkte den Glukose-induzierten Strom auf $79,9 \pm 8,2$ % (n = 22); auch SGK2 konnte SGLT1 nicht stimulieren ($99,5 \pm 3,9$ % des SGLT1+H₂O-Wertes, n = 48). Die Wirkung von Nedd4-2 wurde sowohl durch SGK3 (Zunahme des Stroms um $112,4 \pm 19,4$ %, n = 22) als auch durch ^{T308DS473D}PKB (Zunahme um $106,5 \pm 18,2$ %, n = 27) komplett aufgehoben. Im Gegensatz hierzu wiesen SGLT1+SGK2-exprimierende Zellen bei Koexpression mit Nedd4-2 einen Strom von $66,7 \pm 7,6$ % (n = 23) des Kontrollwertes auf und waren damit nicht signifikant unterschiedlich zu nur SGLT1 und Nedd4-2 exprimierenden Oozyten ($73,5 \pm 5,5$ %, n = 42).

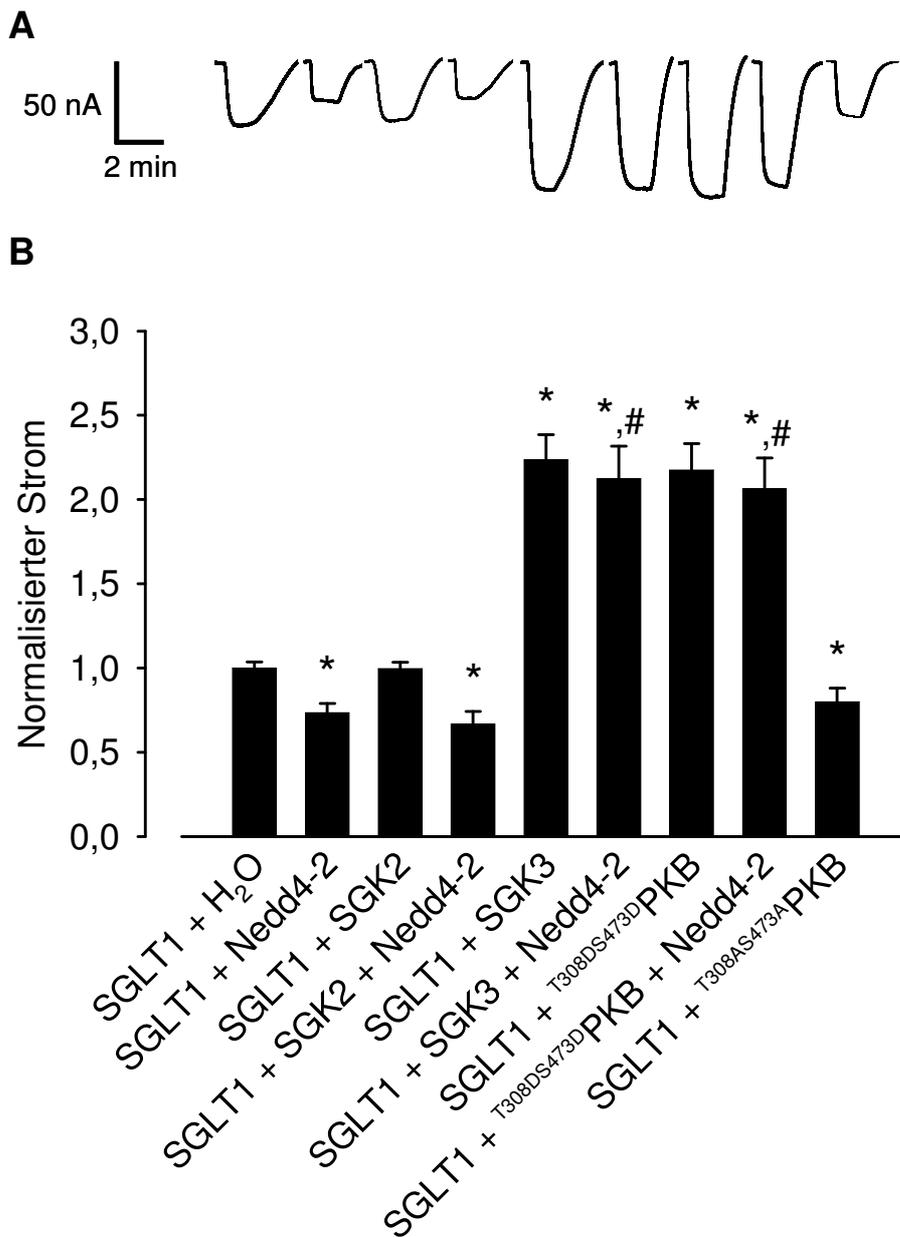


Abb. 15: SGK3 und die konstitutiv aktive ^{T308DS473D}PKB stimulierten SGLT1 und inhibierten die Nedd4-2-Wirkung vollständig. SGK2 zeigte keinen Einfluss auf SGLT1. Die inaktive Mutante ^{T308AS473A}PKB senkte den Glukose-induzierten Strom geringfügig. **A** Originalaufzeichnungen von Oozyten nach Perfusion mit 10 mM Glukose-ND 96-Lösung. **B** arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler. * signifikanter Unterschied zu SGLT1-cRNA+H₂O-injizierten Zellen. # signifikanter Unterschied zu SGLT1+Nedd4-2-exprimierenden Zellen. n = 22 – 48.

3.1.6 Koexpression von SGK3 und PKB in SGLT1-exprimierenden Oozyten

Um zu testen, ob die Effekte von SGK3 und PKB auf SGLT1 additiv sind, wurden *Xenopus-laevis*-Oozyten mit cRNA von SGK3 und aktiver Mutante $T^{308DS473D}$ PKB bzw. cRNA von SGK3 und inaktiver Mutante $T^{308AS473A}$ PKB koinjiziert (Abb. 16).

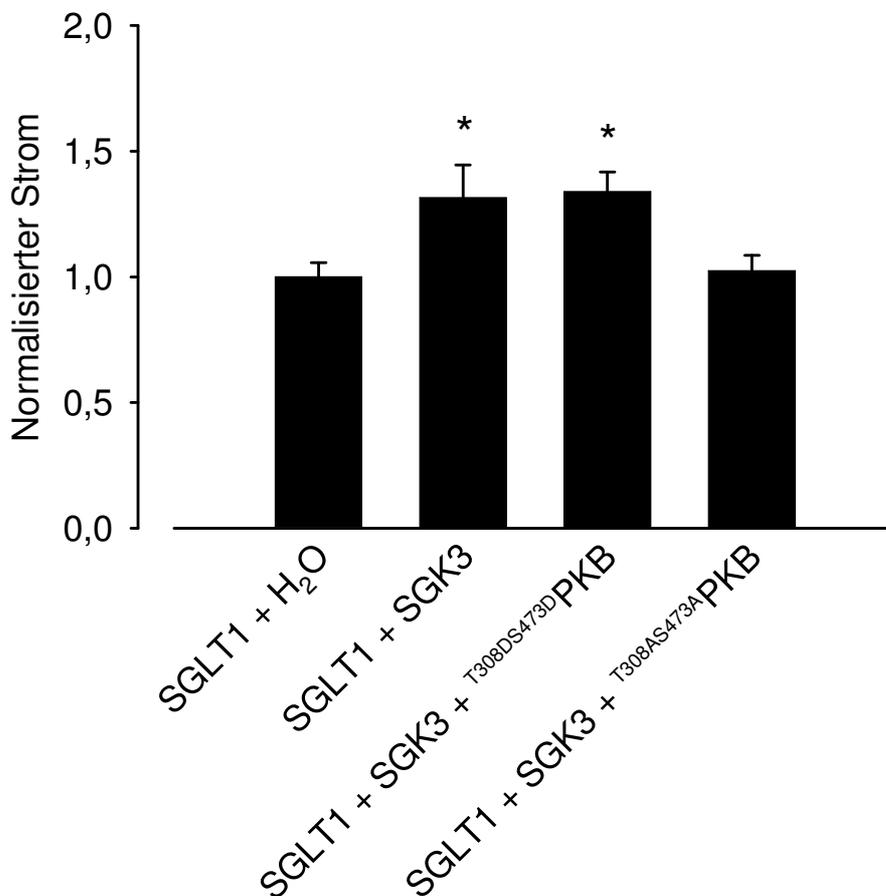


Abb. 16: Zusätzliche Expression von konstitutiv aktiver $T^{308DS473D}$ PKB zeigte im Vergleich zu nur SGK3 exprimierenden Oozyten keine weitere Steigerung des Glukose-induzierten Stroms. Die inaktive Mutante $T^{308AS473A}$ PKB verringerte im Vergleich zu SGLT1+SGK3-cRNA-injizierten Oozyten den Strom um $22,1 \pm 4,6\%$. Angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler. * signifikanter Unterschied zu SGLT1-cRNA+H₂O-injizierten Zellen. n = 16 – 18.

Die zusätzliche Expression von $T^{308DS473D}$ PKB konnte den Glukose-induzierten Strom nicht weiter verstärken ($131,5 \pm 12,9\%$ (n = 17) bei SGLT1+SGK3-exprimierenden Zellen versus $133,9 \pm 7,8\%$ (n = 17) bei

SGLT1+SGK3+^{T308DS473D}PKB-cRNA-injizierten Zellen). Additive Expression von inaktiver ^{T308AS473A}PKB senkte den Strom um $22,1 \pm 4,6 \%$ ($n = 16$) des SGLT1+SGK3-Wertes.

3.2 NaPi IIb

3.2.1 Wirkung der SGK-Mutanten ^{S422D}SGK1 und ^{K127N}SGK1 sowie der Ubiquitinligase Nedd4-2 auf NaPi IIb

Der Natrium-Phosphat-Kotransporter NaPi IIb wurde untersucht, indem NaPi IIb-exprimierende Oozyten mit 3 mM Na₂HPO₄-ND 96-Lösung perfundiert wurden und der durch das Phosphat induzierte Einwärtsstrom gemessen wurde.

In Oozyten, die nur NaPi IIb exprimierten, bewirkte die Phosphat-Lösung einen Strom von $19,2 \pm 2,2$ nA ($n = 30$), der Wert bei Wasser-injizierten Zellen betrug im Vergleich hierzu nur $0,4 \pm 0,3$ nA ($n = 4$) (Abb. 17).

Koexpression von NaPi IIb und Nedd4-2 senkte den Strom auf $11,6 \pm 1,4$ nA ($n = 19$). Die konstitutiv aktive SGK1-Mutante ^{S422D}SGK1 bewirkte verglichen mit NaPi IIb-cRNA+H₂O-injizierten *Xenopus*-Oozyten eine deutliche Zunahme des Stroms auf $46,3 \pm 6,3$ nA ($n = 12$). Auch bei Koexpression von ^{S422D}SGK1 und Nedd4-2 lag der gemessene Einwärtsstrom signifikant über dem der Kontrollzellen ($61,5 \pm 9,8$ nA, $n = 6$ versus $19,2 \pm 2,2$ nA, $n = 30$), das heißt, dass ^{S422D}SGK1 die Nedd4-2-Wirkung komplett aufzuheben vermochte. Die inaktive Mutante ^{K127N}SGK1 hingegen konnte NaPi IIb in seiner Aktivität nicht signifikant beeinflussen ($22,7 \pm 4,1$ nA, $n = 11$).

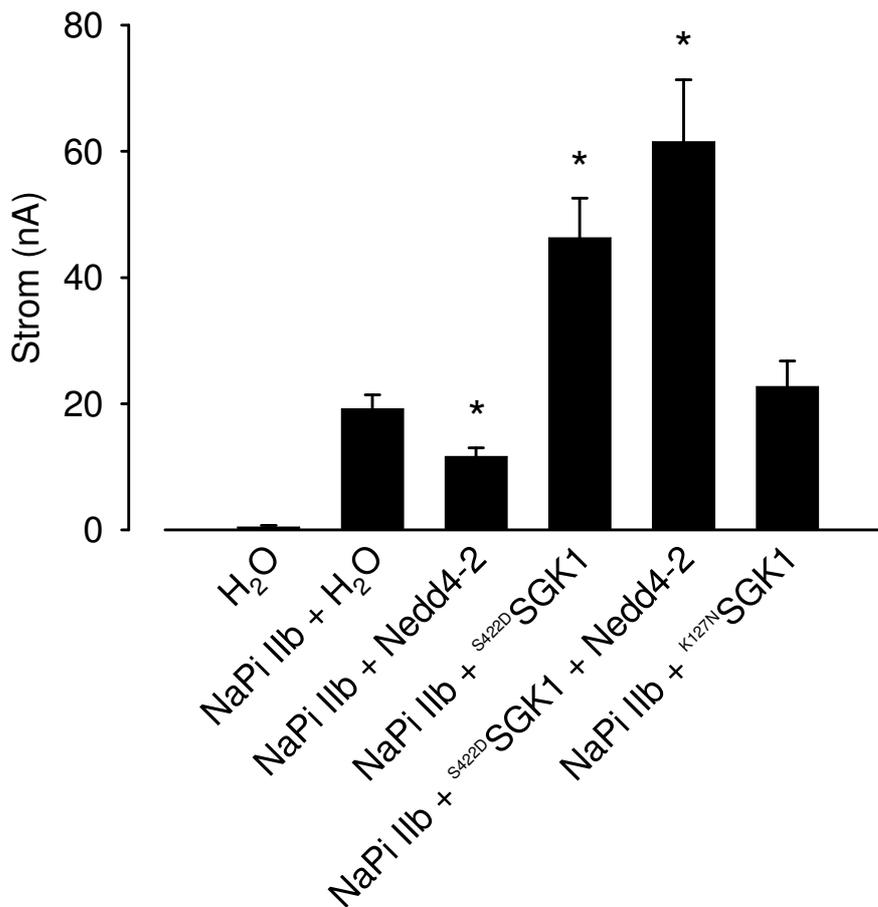


Abb. 17: Koexpression von NaPi IIb und Nedd4-2 senkte verglichen mit nur NaPi IIb exprimierenden Oozyten den Phosphat-induzierten Strom signifikant. Koexpression von NaPi IIb mit der konstitutiv aktiven SGK-Mutante ^{S422D}SGK1 resultierte in einer deutlichen Zunahme des Phosphat-induzierten Stroms. ^{S422D}SGK1 vermochte die Wirkung von Nedd4-2 komplett aufzuheben. Für die inaktive SGK-Mutante ^{K127N}SGK1 konnte kein signifikanter Einfluss auf NaPi IIb nachgewiesen werden. Angegeben sind arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler. * signifikanter Unterschied zu NaPi IIb-cRNA+H₂O-injizierten Zellen. n = 4 – 30.

3.2.2 Wirkung der inaktiven Mutante ^{C938S}Nedd4-2 auf NaPi IIb

Koexpression der inaktiven Nedd4-2-Mutante ^{C938S}Nedd4-2 mit NaPi IIb zeigte im Gegensatz zur Wildtyp-Ubiquitinligase Nedd4-2 keine signifikante Veränderung des Phosphat-induzierten Stroms (115,2 ± 16,2 % der NaPi IIb-cRNA+H₂O-injizierten Oozyten, n = 11, Abb. 18). Dies verdeutlicht, dass für die Modulation der NaPi IIb-Aktivität durch die Ligase Nedd4-2 deren Ubiquitinierungsfunktion nötig ist. Bei dieser Versuchskonstellation konnte die konstitutiv aktive Kinase ^{S422D}SGK1 bei Koinjektion mit ^{C938S}Nedd4-2 den

Phosphat-induzierten Strom deutlich steigern auf $209,7 \pm 24,0$ % der NaPi IIb-cRNA+H₂O-injizierten Oozyten (n = 10).

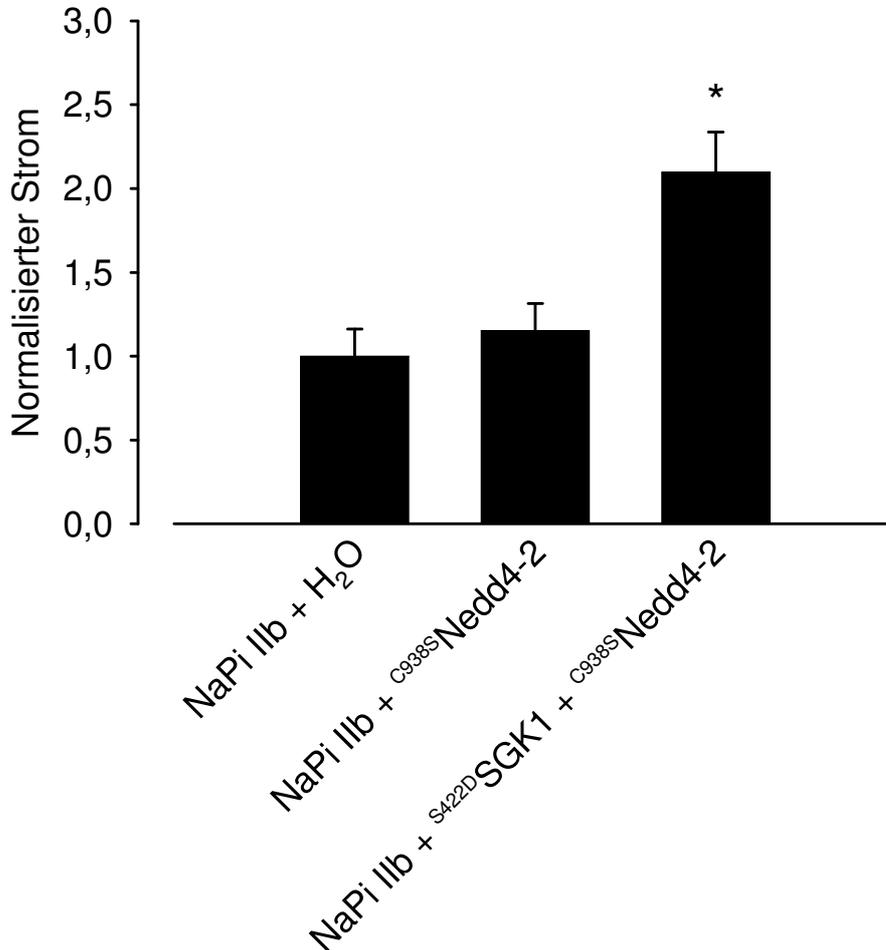


Abb. 18: Durch Koinjektion mit der inaktiven Mutante ^{C938S}Nedd4-2 konnte keine signifikante Stromänderung verglichen mit nur NaPi IIb exprimierenden Oozyten erzielt werden. Angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler. * signifikanter Unterschied zu NaPi IIb-cRNA+H₂O-injizierten Zellen. n = 10 – 11.

3.2.3 Untersuchungen zum Einfluss von ^{S422D}SGK1 und Nedd4-2 auf die Kinetik von NaPi IIb

Um herauszufinden, ob die Modulation der Phosphat-induzierten Ströme durch Nedd4-2 und ^{S422D}SGK1 auf einer Änderung der Aktivität von NaPi IIb oder der Anzahl der Transportermoleküle in der Zellmembran beruht, wurden die

nachfolgend beschriebenen Kinetikmessungen durchgeführt. Es wurde jeweils bei derselben Oozyte der Phosphat-induzierte Strom unter Perfusion mit Na_2HPO_4 -ND 96-Lösung in ansteigenden Konzentrationen von 1 μM , 3 μM , 10 μM , 30 μM , 100 μM und 300 μM Na_2HPO_4 gemessen. Anschließend wurden die Ergebnisse mit einer Michaelis-Menten-Kinetik gefittet (Abb. 19 und Tab. 6).

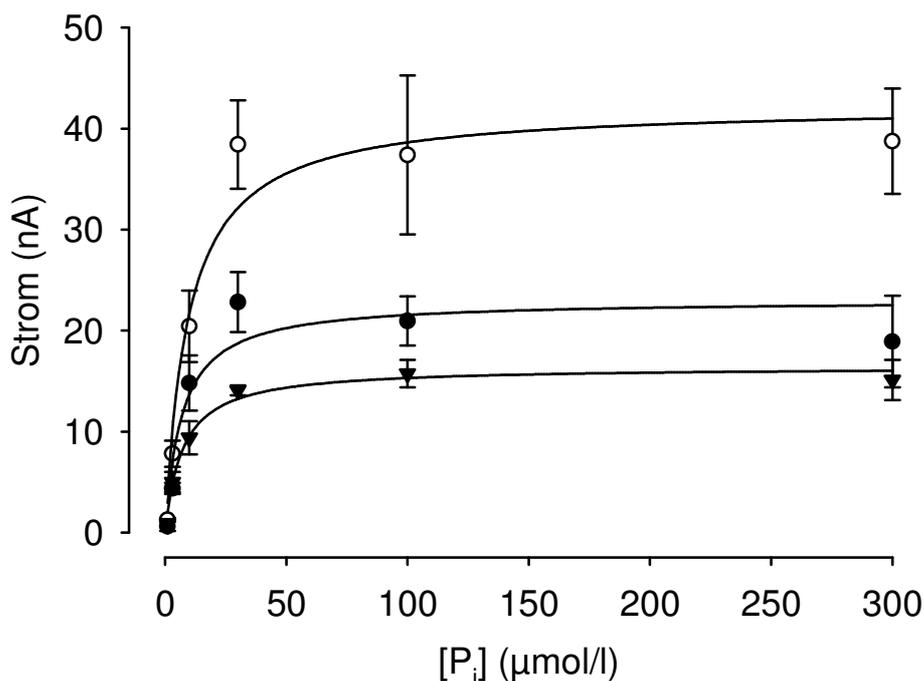


Abb. 19: $\text{S}^{422\text{D}}$ SGK1 (○) und Nedd4-2 (▼) modulierten die Aktivität von NaPi IIb (●) durch Änderung der maximalen Transportrate, während die Affinitätskonstante unverändert blieb. Jeder Datenpunkt repräsentiert den arithmetischen Mittelwert \pm Standardfehler der Phosphat-induzierten Ströme von jeweils 3 Oozyten einer repräsentativen Versuchsreihe.

Injizierte cRNA	K_m ($\mu\text{mol/l}$)	V_{max} (nA)	n
NaPi IIb + H_2O	$5,7 \pm 0,8$	$19,0 \pm 3,2$	12
NaPi IIb + $\text{S}^{422\text{D}}$ SGK1	$8,3 \pm 1,0$	$34,1 \pm 6,1$	12
NaPi IIb + Nedd4-2	$7,6 \pm 1,5$	$12,8 \pm 2,1$	11

Tab. 6: K_m : Affinitätskonstante; V_{max} : maximale Transportrate. Für die maximale Transportrate konnten im Gegensatz zur Affinitätskonstanten signifikante Unterschiede nach Koinjektion von $\text{S}^{422\text{D}}$ SGK1 bzw. Nedd4-2 mit NaPi IIb verglichen mit nur NaPi IIb exprimierenden Oozyten festgestellt werden. Angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler.

Es konnte gezeigt werden, dass sich bei Koexpression von NaPi IIb mit ^{S422D}SGK1 bzw. Nedd4-2 jeweils im Vergleich zu NaPi IIb-cRNA+H₂O-injizierten Oozyten die maximale Transportrate V_{max} änderte, die Affinitätskonstante K_m allerdings unverändert blieb. ^{S422D}SGK1-Koexpression erhöhte V_{max} auf $34,1 \pm 6,1$ nA, Nedd4-2-Koexpression senkte V_{max} auf $19,0 \pm 3,2$ nA.

3.2.4 Wirkung der Kinasen SGK2, SGK3 und ^{T308DS473D}PKB auf NaPi IIb

Wie ^{S422D}SGK1 bewirkte auch SGK3 eine deutliche Stimulation des NaPi IIb-Transporters ($193,2 \pm 20,2$ % des NaPi IIb+H₂O-Wertes, n = 12, Abb. 20).

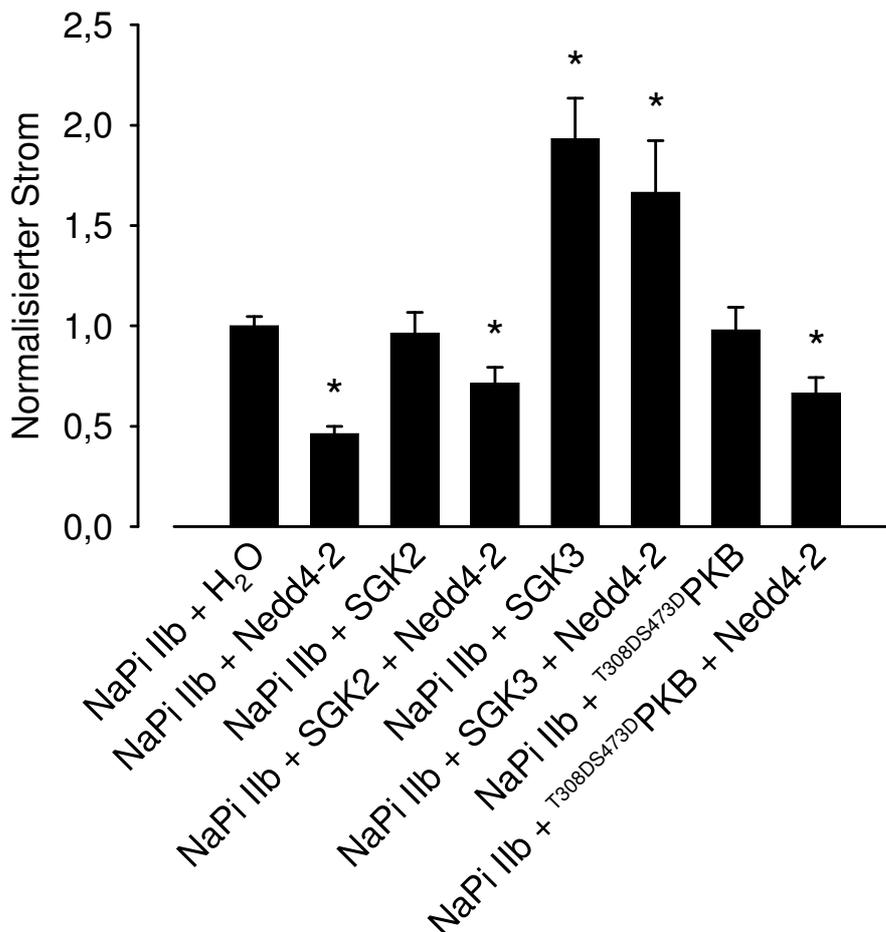


Abb. 20: SGK2 und ^{T308DS473D}PKB zeigten im Gegensatz zu SGK3 keinen signifikanten Einfluss auf NaPi IIb. Angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler. * signifikanter Unterschied zu NaPi IIb-cRNA+H₂O-injizierten Zellen. n = 12 – 49.

Der Nedd4-2-Effekt auf NaPi IIb war bei SGK3-Koexpression komplett reversibel ($166,5 \pm 25,8 \%$, $n = 12$). Ein direkter Einfluss auf den Phosphattransport durch die Kinasen SGK2 und $T^{308DS473D}$ PKB (konstitutiv aktive PKB-Mutante) ließ sich nicht nachweisen (SGK2 $96,3 \pm 10,4 \%$, $n = 18$, $T^{308DS473D}$ PKB $98,0 \pm 11,3 \%$, $n = 40$). Auch die inhibitorische Wirkung von Nedd4-2 ließ sich nur partiell kompensieren.

3.3 CIC-2

3.3.1 Stimulation von CIC-2 durch SGK1, SGK2, SGK3 sowie $T^{308DS473D}$ PKB

Zur Untersuchung des Chloridkanals CIC-2 wurden bei CIC-2-exprimierenden Oozyten die Einwärtsströme nach Hyperpolarisation bei -120 mV gemessen (vgl. Kapitel 2.5). CIC-2-cRNA+H₂O-injizierte Oozyten zeigten im Mittel einen Chloridstrom von $459,85 \pm 62,70$ nA ($n = 72$), während nur mit H₂O injizierte Oozyten einen nicht-spannungsaktivierten Hintergrundstrom von $31,97 \pm 3,88$ nA ($n = 11$) aufwiesen. Der Chloridstrom der CIC-2-Kanäle konnte durch Koexpression mit SGK1 deutlich gesteigert werden auf $221 \pm 22 \%$, $n = 17$ (Abb. 21). Auch SGK2, SGK3 sowie die konstitutiv aktive Mutante $T^{308DS473D}$ PKB stimulierten CIC-2 signifikant (SGK2 auf $176 \pm 24 \%$ ($n = 32$), SGK3 auf $424 \pm 59 \%$ ($n = 37$) und $T^{308DS473D}$ PKB auf $188 \pm 33 \%$ ($n = 26$) des CIC-2+H₂O-Wertes).

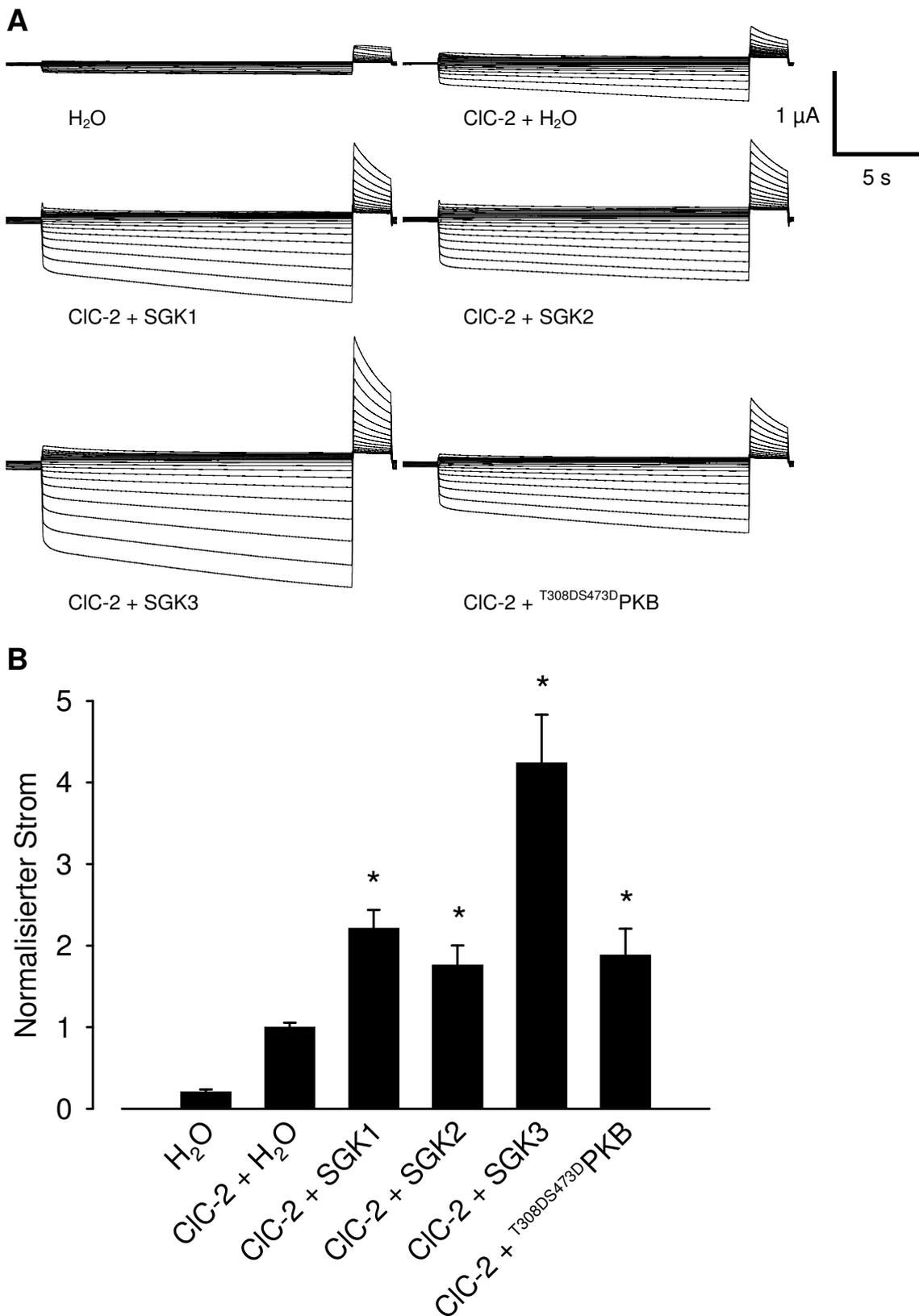


Abb. 21: Stimulation von CIC-2 durch SGK1, SGK2, SGK3 und ^{T308DS473D}PKB. **A** Originalaufzeichnungen. **B** arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler. * signifikanter Unterschied zu CIC-2-cRNA+H₂O-injizierten Zellen. n = 11 – 72.

Die inaktive PKB-Mutante ^{T308AS473A}PKB konnte die CIC-2-Aktivität nicht beeinflussen. Das arithmetische Mittel ^{T308AS473A}PKB-cRNA-injizierter Oozyten lag bei $97 \pm 9 \%$ ($n = 11$) des Kontrollwertes (Abb. 22).

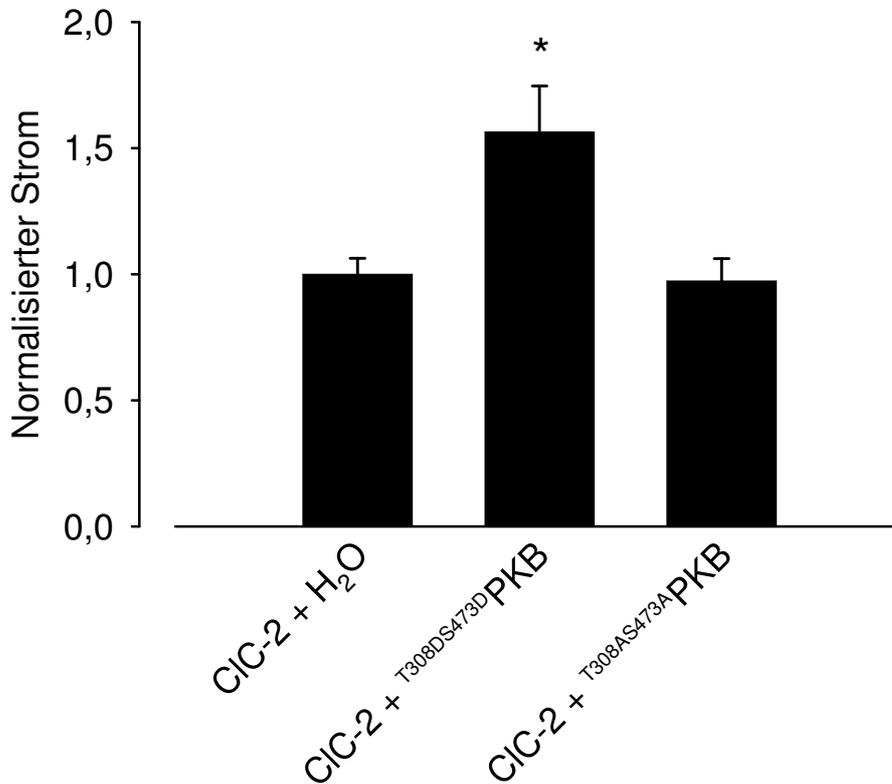


Abb. 22: Die inaktive Mutante ^{T308AS473A}PKB zeigte im Gegensatz zu konstitutiv aktiver ^{T308DS473D}PKB keinen Einfluss auf die CIC-2-Aktivität. Angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler. * signifikanter Unterschied zu CIC-2-cRNA+H₂O-injizierten Oozyten. $n = 11 - 46$.

3.3.2 Aktivität der CIC-2-Mutanten ^{S82A}CIC-2 und ^{S82D}CIC-2

Um zu untersuchen, ob die SGK-Isoformen SGK2 und SGK3 sowie PKB CIC-2 durch direkte Phosphorylierung modulieren, wurde die Aminosäure Serin der wahrscheinlichen Phosphorylierungsstelle an Position 82 des CIC-2-Kanals ausgetauscht. Substitution durch Alanin (^{S82A}CIC-2) sollte die Phosphorylierungsstelle eliminieren, Substitution durch Aspartat (^{S82D}CIC-2) sollte den phosphorylierten und damit aktivierten Zustand imitieren. ^{S82A}CIC-2 wies keinen signifikanten Unterschied zu Wildtyp-CIC-2 auf ($103 \pm 12 \%$,

3 Versuche und Ergebnisse

n = 12), während sich bei ^{S82D}CIC-2 eine deutliche Zunahme des Einwärtsstroms auf $173 \pm 25 \%$ (n = 12) zeigte (Abb. 23). Zusätzliche Expression der konstitutiv aktiven Kinase ^{S422D}SGK1 erhöhte den Einwärtsstrom bei beiden Mutanten, und zwar bei ^{S82A}CIC-2 auf $470 \pm 73 \%$ (n = 12) des CIC-2+H₂O-Wertes und bei ^{S82D}CIC-2 auf $457 \pm 78 \%$ des CIC-2+H₂O-Wertes (n = 12). Da trotz Elimination der Phosphorylierungsstelle ein weiterer Zuwachs des Stroms durch ^{S422D}SGK1-Koexpression erfolgte, existiert vermutlich ein zusätzlicher Regulationsmechanismus.

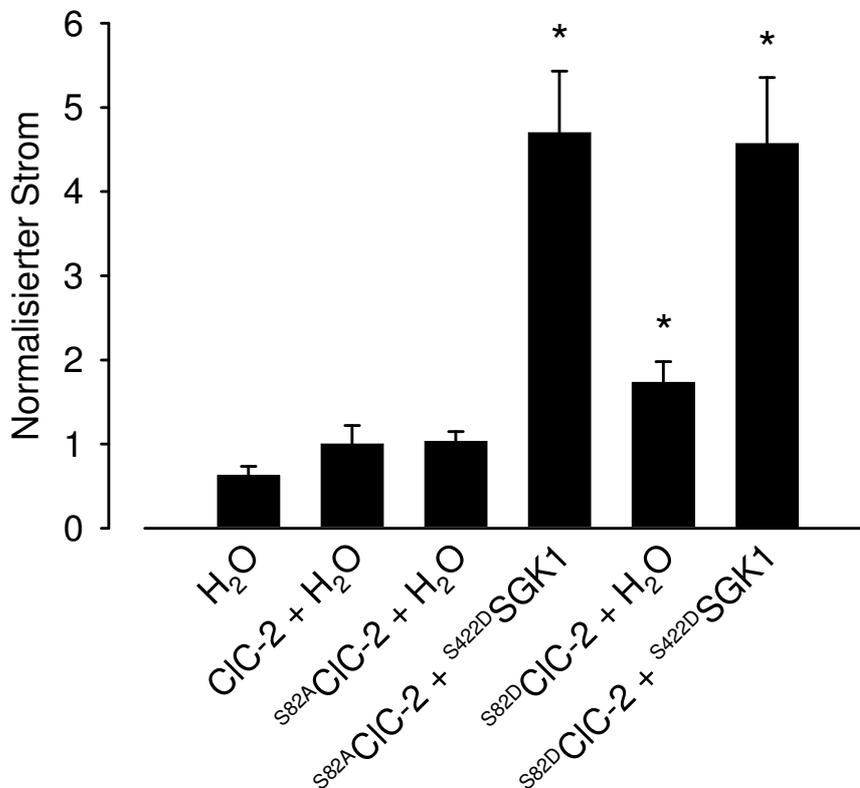


Abb. 23: ^{S82A}CIC-2 (CIC-2-Mutante mit eliminierte Phosphorylierungsstelle) wies im Gegensatz zu ^{S82D}CIC-2 (den phosphorylierten und damit aktivierten Zustand imitierende CIC-2-Mutante) keinen signifikanten Unterschied zu Wildtyp-CIC-2 auf. Koexpression mit ^{S422D}SGK1 resultierte bei beiden Mutanten in einer deutlichen Zunahme des Einwärtsstroms. Angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler. * signifikanter Unterschied zu CIC-2-cRNA+H₂O-injizierten Zellen. n = 10 – 12.

3.3.3 Wirkung von Nedd4-2 und ^{C938S}Nedd4-2 auf CIC-2

Die Ubiquitinligase Nedd4-2 senkte CIC-2-Ströme auf $49 \pm 6 \%$ ($n = 47$) CIC-2-cRNA+H₂O-injizierter Oozyten (Abb. 25). Die katalytisch inaktive Mutante ^{C938S}Nedd4-2 hingegen vermochte den Einwärtsstrom nicht zu beeinflussen (Abb. 24). Der Wert CIC-2+^{C938S}Nedd4-2-exprimierender Oozyten lag bei $98 \pm 12 \%$ ($n = 18$) des Kontrollwertes. Koexpression von SGK1 und ^{C938S}Nedd4-2 mit CIC-2 erhöhte den Strom auf $173 \pm 19 \%$ ($n = 15$).

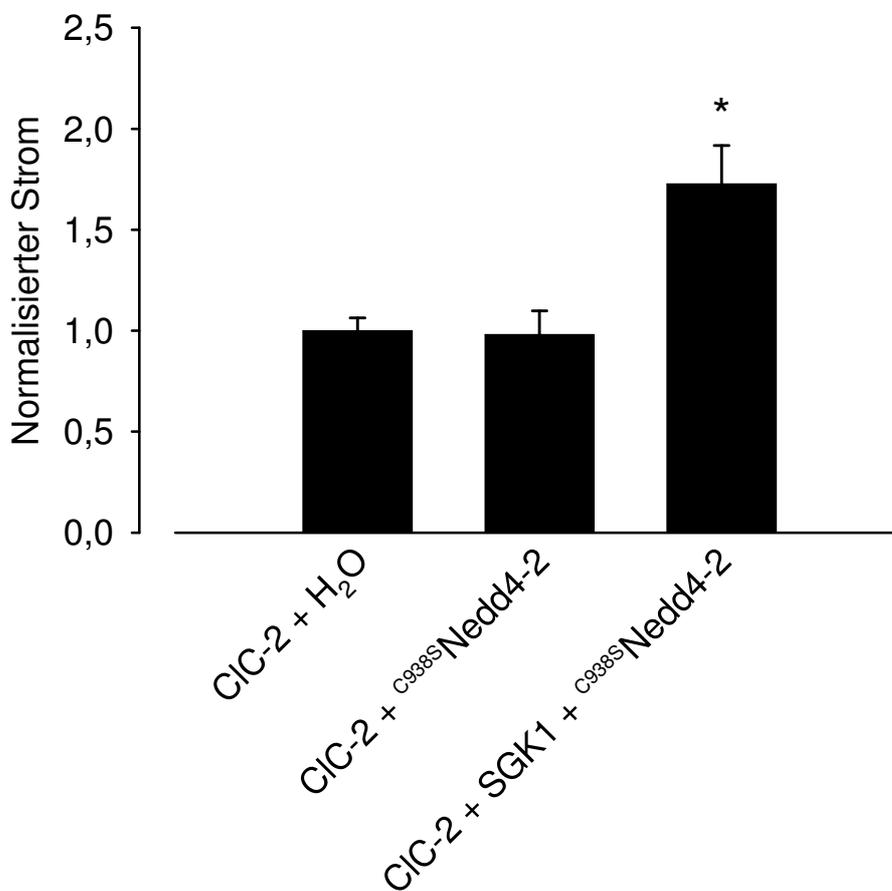


Abb. 24: Die katalytisch inaktive Mutante ^{C938S}Nedd4-2 zeigte keinen signifikanten Einfluss auf CIC-2. Koexpression von ^{C938S}Nedd4-2 und SGK1 erhöhte den CIC-2-Strom signifikant. Angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler. * signifikanter Unterschied zu CIC-2-cRNA+H₂O-injizierten Zellen. $n = 15 - 46$.

3.3.4 Wirkung der SGK-Mutanten ^{S422D}SGK1 und ^{K127N}SGK1 auf CIC-2

Die hemmende Wirkung von Nedd4-2 auf CIC-2 ($49 \pm 6\%$ des CIC-2+H₂O-Wertes, $n = 47$) konnte durch die konstitutiv aktive Kinase ^{S422D}SGK1 vollständig aufgehoben werden (Abb. 25). ^{S422D}SGK1 erhöhte bei Koexpression mit Nedd4-2 den CIC-2-Strom auf $241 \pm 39\%$ ($n = 18$). Koexpression von Nedd4-2 mit der inaktiven SGK-Mutante ^{K127N}SGK1 hingegen steigerte den CIC-2-Strom bezogen auf CIC-2+Nedd4-2-exprimierende Oozyten nur geringfügig (auf $80 \pm 11\%$ des CIC-2+H₂O-Wertes, $n = 13$).

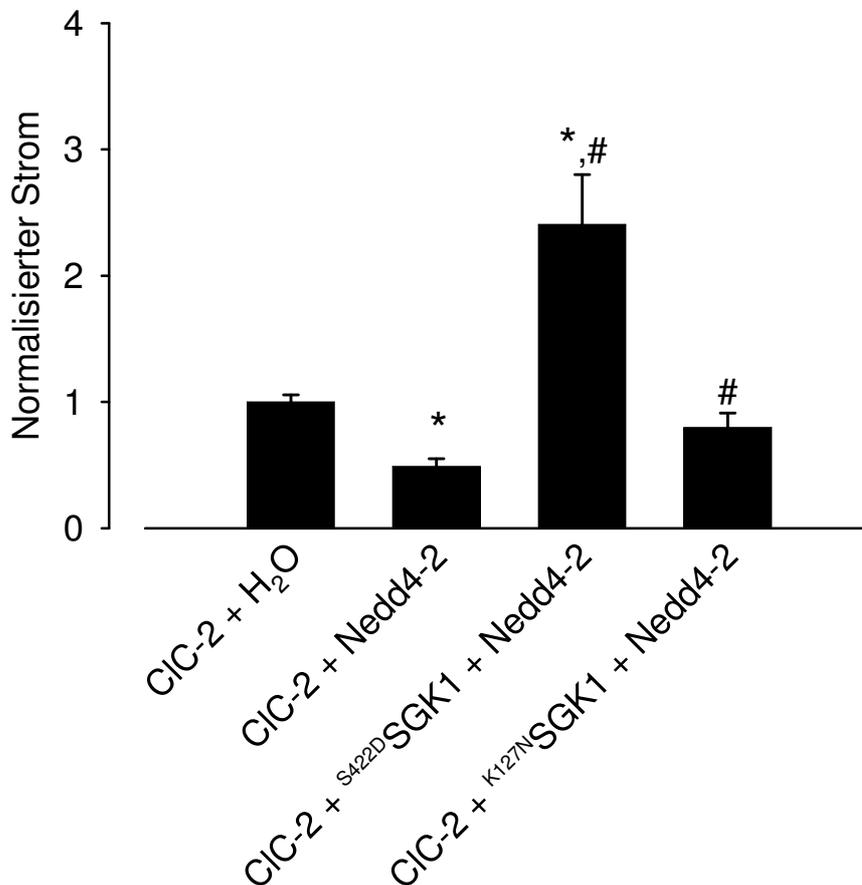


Abb. 25: Nedd4-2 hemmte signifikant den CIC-2-Strom. Koexpression von Nedd4-2 mit konstitutiv aktiver ^{S422D}SGK1 resultierte, verglichen mit CIC-2-cRNA+H₂O-injizierten Oozyten, in einer Steigerung des CIC-2-Stroms. Inaktive SGK (^{K127N}SGK1) konnte den Nedd4-2-Effekt nicht vollständig aufheben. Angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler. * signifikanter Unterschied zu CIC-2-cRNA+H₂O-injizierten Zellen; # signifikanter Unterschied zu CIC-2+Nedd4-2-exprimierenden Zellen. $n = 13 - 72$.

3.3.5 Wirkung der Kinasen SGK2, SGK3 und ^{T308DS473D}PKB auf CIC-2 bei Koexpression mit Nedd4-2

Wie ^{S422D}SGK1 bewirkten auch die Kinasen SGK1, SGK2, SGK3 sowie die konstitutiv aktive Form der PKB (^{T308DS473D}PKB) eine Kompensation des inhibitorischen Effekts von Nedd4-2 auf CIC-2 (Abb. 26).

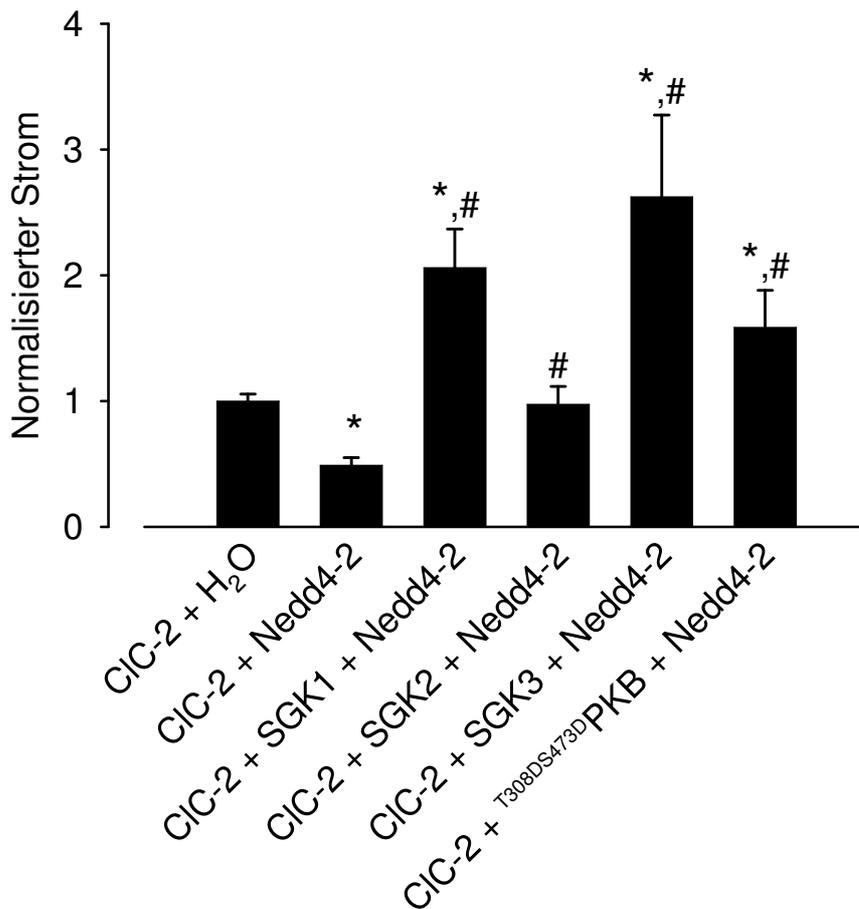


Abb. 26: SGK1, SGK2, SGK3 und die konstitutiv aktive PKB-Mutante ^{T308DS473D}PKB bewirkten eine vollständige Kompensation des inhibitorischen Effekts von Nedd4-2 auf CIC-2. Die Wirkung war am stärksten ausgeprägt bei SGK3, am geringsten bei SGK2. Angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler. * signifikanter Unterschied zu CIC-2-cRNA+H₂O-injizierten Zellen; # signifikanter Unterschied zu CIC-2+Nedd4-2-exprimierenden Zellen. n = 14 – 72.

SGK1 ließ den CIC-2-Strom auf 206 ± 31 % (n = 14) des CIC-2+H₂O-Wertes anwachsen, SGK3 auf 262 ± 65 % (n = 20) und ^{T308DS473D}PKB auf 159 ± 29 % (n = 16). Der Effekt von SGK2 erwies sich als weniger stark ausgeprägt

($98 \pm 14\%$ des CIC-2+H₂O-Wertes, $n = 23$), der Unterschied zu CIC-2+Nedd4-2-exprimierenden Oozyten war jedoch signifikant.

4 Diskussion

4.1 Fehlerdiskussion

4.1.1 Oozyten als Expressionssystem

Xenopus-laevis-Oozyten werden, wie in Kapitel 1.7 beschrieben wird, häufig als Expressionssystem exogener Proteine bzw. mRNA verwendet. Mögliche Fehlerquellen dieses Expressionssystems liegen darin begründet, dass endogene *Xenopus-laevis*-Proteine selbst als Transporter bzw. Kanäle oder Aktivatoren bzw. Inhibitoren der exogenen Proteine fungieren könnten. Endogene Transporter bzw. Kanäle werden aufgrund der nicht notwendigen Nährstoffaufnahme der Oozyten nur in geringem Umfang in der Oozytenmembran exprimiert, müssen aber dennoch bei der Beurteilung der Ergebnisse berücksichtigt werden, insbesondere da durch die Kollagenasebehandlung die Oozytenmembran wesentlich verändert wird (56, 310, 311, 312, 313). Posttranslationale Modifikationen und Regulationszustände der Proteine in *Xenopus*-Oozyten können sich von denen mammalischer Zellen unterscheiden. Auch eventuell vorhandene Unterschiede in der intrazellulären Signalkaskade könnten die Ergebnisse beeinflussen (56). Die in Kapitel 1.6 dargestellte stark variierende intrazelluläre Ionenzusammensetzung könnte zu veränderten Eigenschaften von heterolog exprimierten Membrankanälen bzw. -transportern führen (313).

Eine weitere in Betracht zu ziehende mögliche Fehlerquelle stellt das Faktum dar, dass in den einzelnen Versuchen teilweise RNA verschiedener Spezies verwendet wurde, z. B. Ratten-CIC-2 gemeinsam mit *Xenopus*-Nedd4-2. Unterschiede in der Interaktion zwischen Proteinen verschiedener Spezies im Vergleich zur Interaktion der Proteine nur einer Spezies lassen sich nicht ausschließen. Bei Versuchen mit Oozyten erzielte Ergebnisse lassen sich nicht ohne weiteres auf mammalische Zellen übertragen, da das natürliche Umfeld von Säugetierzellen nicht in Oozyten simuliert werden kann (56).

Ein weiteres Problem ergibt sich aus der Bipolarität der Oozyten: So sind z. B. membranständige Rezeptoren, Kanäle sowie Transporter in beiden Hemisphären unterschiedlich verteilt und ein Großteil der RNA der Oozyte ist in der vegetativen Hemisphäre lokalisiert. Auch die laterale Membranmotilität ist im vegetativen Pol größer (56). Es stellt sich also die Frage, inwieweit die (zufällige) Wahl der Punktionsstelle beim Injizieren bzw. beim Messen Einfluss auf die Ergebnisse hat. Durch die willkürliche Wahl des Injektionsortes der cRNA könnten sich Unterschiede in der Expressionsrate der Proteine ergeben (56). Die Lokalisation der Messelektroden sollte die Stromgröße nicht beeinflussen, da bei der Zwei-Elektroden-*Voltage-Clamp*-Methode im Gegensatz zur *Patch-Clamp*-Methode nicht Ströme über ein definiertes Areal der Membran, sondern Ströme über die gesamte Oozytenmembran gemessen werden.

Ein wesentlicher Nachteil der *Voltage-Clamp*-Technik ist, dass nur sehr eingeschränkt quantitative Aussagen möglich sind. Eine Reihe verschiedener Faktoren beeinflusste die Expressionsrate der jeweiligen Proteine: Differenzen in der Menge der injizierten cRNA ließen sich nicht gänzlich vermeiden. Ursachen hierfür waren Pipettierungenauigkeiten beim Ansetzen und Verdünnen der cRNA sowie Ungenauigkeiten beim Injizieren mit Hilfe des Mikroinjektors. Auch die Qualität der cRNA war Störeinflüssen wie mehrmaligem Auftauen und Wiedereinfrieren, Zentrifugieren oder Kontamination mit RNAsen unterworfen. Die Expressionsrate war außerdem abhängig von der während der Inkubation vorherrschenden Temperatur, der Jahreszeit, möglichen Schwankungen in der Zusammensetzung der Aufbewahrungslösung sowie der Qualität der Oozyten.

Unterschiede in der Qualität der Oozyten äußerten sich in der Größe des Ruhemembranpotenzials und des basalen Leckstroms. Es wurden nur Zellen verwendet, deren Ruhepotenzial ≤ -20 mV betrug. Einfluss auf die Oozytenqualität hatten neben dem Alter und dem Entwicklungsstand des jeweiligen Frosches die Präparation der Oozyten (insbesondere der Kollagenaseverdau) sowie deren Reifegrad. Um diese Störgrößen zu minimieren, wurden alle Versuche mindestens dreimal an Oozyten aus

Präparationen verschiedener Frösche durchgeführt. Es wurden nur Oozyten der Stadien V und VI verwendet, deren Intaktheit täglich unter dem Stereomikroskop kontrolliert wurde. Zudem wurde täglich die Aufbewahrungslösung der Oozyten ausgetauscht.

Diese Nachteile der Zwei-Elektroden-*Voltage-Clamp*-Methode werden durch eine Reihe entscheidender Vorteile aufgewogen: So sind die Ergebnisse qualitativ ausgesprochen gut reproduzierbar. Transporterbedingte Ströme lassen sich aufgrund der in sehr hoher Dichte exprimierten Proteine klar von Artefakten differenzieren. Ein weiterer Vorteil liegt im unkomplizierten und raschen Verändern von Konzentrationen bzw. Austauschen von Lösungen oder Lösungsbestandteilen.

4.1.2 Lösungen

Alle Lösungen wurden regelmäßig frisch angesetzt und meist als Stammlösung bei 8 °C lichtgeschützt im Kühlschrank aufbewahrt. Dies sollte den schädigenden Einfluss von Licht und Wärme auf die Chemikalien minimieren. Verunreinigungen und geringe Konzentrationsschwankungen der einzelnen Bestandteile durch Messungenauigkeiten beim Ansetzen der Lösung können nicht ausgeschlossen werden. Regelmäßig wurde die Gesamtmolarität überprüft, sie sollte 200 – 220 mosmol/l betragen. Vor jeder Messreihe wurde der pH-Wert exakt auf 7,4 eingestellt. Vor Verwendung der Lösungen wurden diese auf Zimmertemperatur erwärmt.

4.1.3 Geräte

Von anderen Geräten ausgehende elektrische Störeinflüsse wurden durch einen den gesamten Versuchsaufbau umgebenden Faraday'schen Käfig weitgehend abgeschirmt (211). Zusätzlich wurden die Daten bei der Aufzeichnung mit 10 Hz gefiltert.

Im Verlauf der Versuche nutzte sich die AgCl_2 -Beschichtung der Messelektroden ab. Um zu verhindern, dass sich dadurch der Elektrodenwiderstand erhöhte, musste diese regelmäßig durch Chloridieren erneuert werden.

Durch Verstopfen oder Abbrechen der Elektrodenspitze konnte sich der Widerstand der Glaselektroden ändern. Daher wurde vor und nach dem Messen jeder einzelnen Oozyte der Elektrodenwiderstand in der Badlösung kontrolliert und nötigenfalls die Elektrode ausgetauscht.

4.1.4 Auswertung und Statistik

Verschiedene Einflüsse, etwa die Membraneigenschaften der einzelnen Oozyte oder die Flussrate, führten teilweise zu leichten Schwankungen oder Veränderungen des basalen Stromes. Es wurden nur Oozyten verwendet, deren Ruhemembranpotenzial mindestens -20 mV betrug. Es wurde mit dem Start der Messung so lange zugewartet, bis sich das Ruhemembranpotenzial vollständig stabilisiert hatte. Oozyten, deren Ruhemembranpotenzial sich nicht stabilisierte, wurden nicht verwendet. Alle Versuche wurden mit Oozyten aus Präparationen von mindestens drei verschiedenen Fröschen durchgeführt. Bei quantitativ stark voneinander abweichenden Resultaten wurden die Ergebnisse normalisiert; Voraussetzung war, dass sich qualitativ keine Unterschiede ergeben hatten (vgl. Kapitel 2.6).

4.2 Die Verwendung der *Voltage-Clamp*-Methode zur Untersuchung von SGLT1, NaPi IIb und CIC-2

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete *Voltage-Clamp*-Technik weist verglichen mit anderen Methoden wesentliche Vorteile auf. So ermöglicht die Expression der jeweiligen Proteine in sehr hoher Konzentration eine meist klare Abgrenzung von Transportphänomenen bzw. Auswirkungen von

Regulatorproteinen gegenüber Artefakten. Es können zuverlässige Aussagen zur Stöchiometrie von Transportern, zu diese Transporter beeinflussenden Faktoren und Abhängigkeiten wie pH- oder Konzentrationsabhängigkeiten und zu Kinetikeigenschaften getroffen werden (33, 64). Regulatorische Einflüsse können durch zusätzliche Expression weiterer Proteine mit z. B. stimulierender oder inhibitorischer Wirkung untersucht werden. Die Ergebnisse sind meist zuverlässig reproduzierbar, nicht zuletzt auch dank der relativ einfach durchzuführenden *Voltage-Clamp*-Methode.

Im Folgenden sind wesentliche Nachteile dieser Technik aufgeführt: Es lassen sich keine quantitativen bzw. nur eingeschränkt quantitative Schlüsse ziehen (33). Die Oozyte ist im Vergleich zu menschlichen Zellen mit anderen Proteinen (strukturelle Proteine, Regulatorproteine wie *Second-Messenger*-Systeme etc.) ausgestattet, die möglicherweise die nach cRNA-Injektion exprimierten zu untersuchenden Proteine beeinflussen; Ionenkonzentrationen in Oozyten unterscheiden sich deutlich von denen beim Menschen; die natürliche Umgebung der Transportproteine lässt sich in den Oozyten nicht simulieren. Ergebnisse können daher nur bedingt auf den Menschen übertragen werden. Des Weiteren lassen sich molekularbiologische Vorgänge mit der *Voltage-Clamp*-Technik kaum untersuchen (33, 56).

4.3 SGLT1

In den oben angeführten Ergebnissen wurde gezeigt, dass elektrische Ströme über SGLT1 in Oozyten durch Nedd4-2 gesenkt werden und durch SGK1 bzw. die konstitutiv aktive ^{S422D}SGK1 sowie die verwandten Kinasen SGK3 und PKB erhöht werden, indem möglicherweise SGK bzw. PKB die Nedd4-2-Ubiquitinligase durch Phosphorylierung inaktiviert und so die Bindung an deren Target verhindert; ein derartiger Regulationsmechanismus wurde bereits für den renalen epithelialen Natriumkanal ENaC und den kardialen Natriumkanal SCN5A nachgewiesen (vgl. Kapitel 1.4 und 1.5). SGK1 wird im menschlichen Darm vorwiegend in Enterozyten von Zotten exprimiert, in den Krypten des

Ileums findet praktisch keine Expression statt (Abb. 4). In den einzelnen Enterozyten ließ sich SGK1 immunhistochemisch nahe der apikalen Membran detektieren und war hier kolokalisiert mit Nedd4-2 (Abb. 6); dies weist darauf hin, dass SGK1 und Nedd4-2 eine wesentliche Rolle in der Regulation intestinaler Transporter spielen, die insbesondere an der apikalen Membran exprimiert werden. Für SGK2 sowie die inaktiven Mutanten ^{K127N}SGK1, ^{T308AS473A}PKB und ^{C938S}Nedd4-2 konnte kein Einfluss auf SGLT1 festgestellt werden. Durch Injektion inaktiver Mutanten konnten unspezifische Effekte z. B. durch Überlastung der Proteinsynthese oder Zellschädigung weitgehend ausgeschlossen werden. Die in Oozyten exprimierten Wildtypen von SGK1 und SGK3 sind nicht konstitutiv aktiv, sondern erfordern eine Aktivierung durch Phosphatidylinositol-3-Kinase und Phosphoinositid-abhängige Kinase, die in Kapitel 1.4 ausführlich beschrieben ist. Offensichtlich stellt diese Aktivierung in Oozyten keinen limitierenden Faktor dar, da sich die Wildtyp-Kinasen in den in der vorliegenden Arbeit präsentierten und auch in früheren Untersuchungen als ähnlich wirkungsvoll erwiesen wie die konstitutiv aktive ^{S422D}SGK1.

Die im Rahmen der SGLT1-Versuchsreihen erzielten Resultate werden gestützt von Chemilumineszenzuntersuchungen, in denen SGLT1- und SGK1-exprimierende Oozyten eine um etwa den Faktor 2 gesteigerte Expressionsrate von SGLT1 in der Plasmamembran aufwiesen verglichen mit nur SGLT1 exprimierenden Zellen (63); durch Koexpression von Nedd4-2 konnte eine Reduktion der Oberflächenexpression von SGLT1 auf ca. 50 % erzielt werden. Dies deutet daraufhin, dass die Aktivität des Glukosetransports über SGLT1 durch eine veränderte Anzahl von Transporterproteinen in der Zellmembran reguliert wird. Die fehlende Wirksamkeit von SGK2 wurde in *Western-Blot*-Analysen bestätigt, in welchen sich eine Phosphorylierung von Nedd4-2 durch SGK1 und SGK3, nicht aber durch SGK2 nachweisen ließ (63).

Die Transkription von SGK1 wird neben Gonadotropinen, einer Reihe von Zytokinen einschließlich TGF- β , Zellschrumpfung und Serum auch durch Mineralokortikoide und Glukokortikoide stimuliert; exprimierte SGK1 wird von IGF-I, Insulin und oxidativem Stress aktiviert (vgl. Kapitel 1.4). So konnte z. B.

gezeigt werden, dass sich durch mehrtägige Behandlung mit Dexamethason bei Wildtyp-Mäusen der Glukose-induzierte Strom und die Expressionsrate von SGLT1 in der Bürstensaummembran (mittels *Western Blot* bestimmt) steigern ließen, nicht jedoch bei SGK1-Knock-out-Mäusen (99). Ussingkammerexperimente mit SGK3-Knock-out-Mäusen wiesen einen signifikant geringeren Glukose-induzierten Strom über das Jejunum von Mäusen nach; die orale Nahrungsaufnahme bei diesen Mäusen hingegen war erhöht, möglicherweise um die verminderte Glukoseaufnahme im Darm zu kompensieren (249).

Im Rahmen von Zwillingsstudien wurde belegt, dass der E8CC/CT;I6CC-Polymorphismus im SGK1-Gen mit erhöhtem Blutdruck assoziiert ist (34, 35). Derselbe Polymorphismus geht auch mit einem höheren *Body-Mass-Index* (BMI) einher (63); dieser erhöhte BMI könnte bedingt sein durch gesteigerte SGLT1-Expressionsraten. Möglicherweise kommt es durch rascheren Anstieg der Plasmaglukosekonzentration zu einer exzessiven Insulinfreisetzung und nachfolgend zu einer gesteigerten Lipidsynthese (91). Allerdings gibt es Hinweise, dass SGK1 auch über andere Transporter wie den spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv1.3 Einfluss auf die Regulation des Körpergewichts nimmt (94, 95, 299, 335). Hypertonie und Stammfettsucht kommen auch beim Cushing-Syndrom vor, das durch auf unterschiedlicher Ätiologie beruhende erhöhte Plasmacortisolspiegel gekennzeichnet ist und an weiteren Symptomen z. B. Osteoporose, Myopathie, Blutbildveränderungen, eine verminderte Glukosetoleranz, psychische Veränderungen, bei Kindern Wachstumshemmung, bei Frauen Virilisierung, Hirsutismus und Amenorrhoe und bei Männern Potenzstörungen aufweist. Das metabolische Syndrom zeigt eine ähnliche Symptomatik mit Hypertonie, Übergewicht, Insulinresistenz, Hyperinsulinämie u. a., allerdings sind hier die Plasmacortisolspiegel gewöhnlich nicht erhöht (13, 243). Bei Typ 2-Diabetikern wurde demonstriert, dass die Proteinkonzentrationen von SGLT1 und GLUT5 (Fruktosetransporter) in der Bürstensaummembran des Duodenums 3- bis 4-fach höher als bei Gesunden sind (69). Ob SGLT1 oder/und SGK eine wesentliche Rolle beim

Cushing-Syndrom oder beim metabolischen Syndrom spielt bzw. spielen, sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Es ist bekannt, dass Phloridzin spezifisch SGLT1 hemmt. In der vorliegenden Arbeit inhibierte Phloridzin vollständig den Glukose-induzierten Strom über SGLT1, auch bei Stimulation von SGLT1 durch SGK1. Es ist interessant zu spekulieren, durch Inhibition von SGLT1 die Glukoseaufnahme über den Darm zu reduzieren. Es gibt in der Tat Hinweise, dass SGLT-Inhibitoren gegen Übergewicht wirksam sein könnten (301).

Zunächst wurde vermutet, dass Nedd4-2 nur an PY-Motive (Pro-Pro-Xxx-Tyr) binden kann, um das jeweilige Protein für den Abbau zu markieren (30); zwischenzeitlich wurden weitere Sequenzen gefunden, die als Bindungsstelle für Nedd4-2 dienen, so z. B. Pro-Xxx-Pro-Pro-Tyr, Pro-Pro-Leu-Pro oder pSer/pThr (vgl. Kapitel 1.5). SGLT1 besitzt keines dieser Motive. Allerdings ist z. B. von dem spannungsgesteuerten Kaliumkanal Kv1.3 bekannt, dass er trotz eines fehlenden PY-Motivs ebenfalls von Nedd4-2 reguliert wird; möglicherweise ist hier ein Regulatorprotein (das sogenannte KChAP, das auch als Chaperon fungiert) involviert (155); dieses KChAP enthält in seiner Aminosäuresequenz ein PY-Motiv und kann über den N-Terminus von Kv1.3 mit diesem interagieren; es ist nachweislich in der Lage, Kv1.3 zu stimulieren. Ob Nedd4-2 indirekt über ein solches Intermediärprotein mit SGLT1 interagiert oder direkt über noch nicht bekannte Bindungssequenzen, ist bisher nicht untersucht worden.

4.4 NaPi IIb

Ähnliche Ergebnisse wie für SGLT1 zeigten sich auch für den für die intestinale Phosphatabsorption verantwortlichen Natrium-Phosphat-Kotransporter NaPi IIb: So erniedrigte Nedd4-2 den Strom über NaPi IIb; SGK1 bzw. ^{S422D}SGK1 sowie SGK3 erhöhten den Strom und hoben bei Koexpression die Wirkung von Nedd4-2 auf; allerdings ließ sich NaPi IIb im Gegensatz zu SGLT1 nicht durch PKB stimulieren. Die in Kapitel 3.2.3 beschriebenen Kinetikmessungen ergaben

bei Koexpression von NaPi IIb mit ^{S422D}SGK1 eine erhöhte und bei Koexpression mit Nedd4-2 eine reduzierte maximale Transportrate V_{\max} , während die Affinitätskonstante K_m unverändert blieb; dies spricht dafür, dass sich durch ^{S422D}SGK1 bzw. Nedd4-2 die Expressionsrate von NaPi IIb und damit die Anzahl der Transportermoleküle in der Membran ändert und nicht die Aktivität eines einzelnen NaPi IIb-Moleküls. SGK2 und die inaktiven Mutanten von SGK1 und Nedd4-2 zeigten jeweils keine Wirkung, vgl. hierzu auch den in Kapitel 4.3 diskutierten fehlenden Nachweis einer Phosphorylierung von Nedd4-2 durch SGK2.

Der intestinale Phosphattransport ist essenziell für die Phosphathomöostase und wird von einer Vielzahl von Hormonen stimuliert wie z. B. 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃, Glukokortikoiden, Wachstumshormon, IGF-I und weiteren Zytokinen (vgl. Kapitel 1.2). Von TGF- β ist bekannt, dass er ein starker Stimulator der SGK1-Expression ist und dass dessen Rezeptoren in Dünndarmzellen exprimiert werden (12, 212, 245, vgl. auch Kapitel 1.4); TGF- β aktiviert den NaPi-III-Transporter Glvr-1 (218), hemmt hingegen NaPi IIa (162). Inkubation von Intestine 407-Zellen, die eine endogene Expression von Nedd4-2, SGK1 und NaPi IIb aufweisen, mit TGF- β bewirkt in der Tat eine erhöhte Phosphataufnahme, die mit gesteigerter SGK1-Expression und vermehrter Nedd4-2-Phosphorylierung korreliert (216). Die Stimulation von SGK1 durch TGF- β könnte bei der Colitis ulcerosa und beim Morbus Crohn eine Rolle spielen, da beide Erkrankungen mit einer exzessiven lokalen Expression von Zytokinen (12, 212, 245) und von SGK1 (307) einhergehen.

Da NaPi IIb kein Prolin-Tyrosin-Motiv besitzt, das nach bisherigem Kenntnisstand für die Interaktion mit der Ubiquitinligase Nedd4-2 erforderlich ist, interagiert Nedd4-2 möglicherweise über ein Intermediärprotein mit NaPi IIb. Auch eine direkte Stimulation des Transporters mittels unmittelbarer Phosphorylierung des NaPi IIb-Proteins durch SGK1 und SGK3 ist in Erwägung zu ziehen, vgl. hierzu auch Kapitel 4.3.

4.5 CIC-2

Der Chloridkanal CIC-2 ließ sich durch die Kinasen SGK1, SGK3 und PKB und im Gegensatz zu SGLT1 und NaPi IIb auch durch SGK2 stimulieren. Bei CIC-2 zeigten die inaktiven Mutanten wie bei SGLT1 und NaPi IIb jeweils keine Wirkung.

Von CIC-2 ist bekannt, dass er über phosphorylierungsabhängige Mechanismen von PKA (cAMP-abhängige Kinase) und PKC (Proteinkinase C) je nach Zelltyp und Organismus aktiviert bzw. gehemmt wird (89, 255, 258, 284). Von der M-Phase-spezifischen Cyclin-abhängigen Kinase p34^{cdc2}/Cyclin B (93) kann CIC-2 direkt phosphoryliert und dadurch inhibiert werden. Eine Mutation an der entsprechenden Phosphorylierungsstelle (Ersetzen von Serin durch Alanin an Position 632) verhindert eine Regulation durch p34^{cdc2}/Cyclin B. Eine Aktivierung von CIC-2 ist auch durch Serin-/Threonin-Dephosphorylierung über eine direkte Interaktion von Phosphatase 1 α und 1 β (PP1 α und PP1 β) mit dem zytosolischen C-Terminus von CIC-2 möglich (93). Diese zwei Phosphatasen weisen eine hohe Homologie zu den Typ 1-Proteinphosphatasen CeGLC-7 α und CeGLC-7 β auf, von welchen bekannt ist, dass sie das *Caenorhabditis-elegans*-CIC-2-Ortholog CLH-3 durch Dephosphorylierung aktivieren (246). Diese oben angeführten Beispiele einer CIC-2-Aktivierung durch Dephosphorylierung stehen im Widerspruch zu den in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnissen, auf den weiter unten näher eingegangen werden soll.

Die Aminosäuresequenz von CIC-2 enthält eine mögliche Phosphorylierungsstelle für die SGK, nämlich einen Serinrest an Position 82. Durch Inaktivierung bzw. konstitutive Aktivierung von CIC-2 mit Hilfe eines Aminosäureaustauschs an dieser Position 82 (Ersetzen durch Alanin führt zur Inaktivierung, Ersetzen durch Aspartat zur Aktivierung) ließ sich allerdings keine wesentliche Änderung zur Wildtyp-Form von CIC-2 feststellen, die CIC-2-Mutanten konnten weiterhin durch Koexpression mit SGK1 stimuliert werden; lediglich bei alleiniger Expression der konstitutiv aktiven CIC-2-Mutante zeigte sich verglichen mit Wildtyp-CIC-2 eine Zunahme des Einwärtsstroms. Dies

deutet darauf hin, dass ein weiterer Mechanismus z. B. über Intermediärproteine existiert, durch welchen CIC-2 reguliert wird. Einen solchen Mechanismus könnte die indirekte Stimulation von CIC-2 mittels SGK durch Hemmung der CIC-2-Ubiquitinierung darstellen. Eine derartige Regulation könnte auch die oben angeführte Diskrepanz zu den bereits bekannten direkten Aktivierungswegen von CIC-2 durch Dephosphorylierung erklären.

Die im Ergebnisteil aufgeführten Resultate werden gestützt von Chemilumineszenzuntersuchungen, nach welchen die Oberflächenexpression von CIC-2 in Oozyten, die zusätzlich SGK1, SGK3 oder PKB exprimierten, signifikant höher war als in nur CIC-2 exprimierenden Zellen (215); entsprechend ließ sich die Expressionsrate durch Koinjektion von CIC-2 mit Nedd4-2 reduzieren. Eine unspezifische Hemmung der CIC-2-Aktivität z. B. durch Proteinsyntheseüberlastung nach Injektion exogener Nedd4-2-RNA lässt sich weitgehend dadurch ausschließen, dass die inaktive Mutante ^{C938S}Nedd4-2 keinen Einfluss auf CIC-2 zeigte. Es ist belegt, dass CIC-2 von einer sogenannten E3-Ubiquitinligase, über deren Identität bislang nur wenig bekannt ist, ubiquitiniert werden kann (345). Aminosäuresequenzen, die reich an Prolin, Glutaminsäure, Serin und Threonin sind (bezeichnet als „PEST-Sequenzen“), scheinen Signale zur Ubiquitinierung und zur nachfolgenden Proteolyse darzustellen (239). CIC-2 umfasst 5 dieser PEST-Sequenzen; Ubiquitinierungsassays konnten in der Tat eine Polyubiquitinierung nachweisen, die insbesondere um das Ende der M-Phase des Zellzyklus besonders ausgeprägt ist. Dies könnte das rasche Verschwinden der Chloridkanäle nach der Zellteilung erklären. Die Ubiquitinierungsrate von CIC-2 konnte gesteigert werden durch eine Phosphorylierung des Kanals, katalysiert von der bereits oben erwähnten M-Phase-spezifischen Cyclin-abhängigen Kinase p34^{cdc2}/Cyclin B (345).

Die dargelegten möglichen Regulationsmechanismen von CIC-2 über SGK bzw. PKB und Nedd4-2 könnten die Beschleunigung der Lungenreifung des Fetus durch Cortisonpräparate bei einer drohenden Frühgeburt erklären. Durch SGK aktivierter CIC-2 könnte bei Patienten mit zystischer Fibrose möglicherweise zumindest zu einem gewissen Grad Funktionen des defekten CFTR

übernehmen (22). Die für SGK nachgewiesene Beteiligung an der Zellvolumenregulation könnte über eine Einflussnahme auf CIC-2 erfolgen (304).

5 Zusammenfassung

Verschiedene Transporter bzw. Kanäle wie z. B. der renale epitheliale Natriumkanal ENaC werden nach Ubiquitinierung (Bindung von Ubiquitin an Prolin-reiche Aminosäuresequenzen wie z. B. das sogenannte PY-Motiv) durch die Ubiquitinligase Nedd4-2 über nachfolgenden Proteinabbau bzw. nachfolgende Endozytose herunterreguliert. Nedd4-2 selbst wird von der Serum- und Glukokortikoid-induzierbaren Kinase SGK1 durch Phosphorylierung inaktiviert, wodurch eine indirekte Aktivierung des jeweiligen Transporters bzw. Kanals erfolgt. Einige Transporter werden durch direkte Phosphorylierung mittels SGK1 stimuliert.

Anhand von *Voltage-Clamp*-Untersuchungen wird mit der vorliegenden Arbeit dargelegt, dass auch der vorwiegend im Darm exprimierte Natrium-Glukose-Kotransporter SGLT1 von Nedd4-2 inhibiert und von SGK1 aktiviert wird. SGK1 hob bei Koexpression mit Nedd4-2 die Nedd4-2-Wirkung vollständig auf, vermutlich durch Phosphorylierung und damit Inaktivierung von Nedd4-2. Die inaktive Nedd4-2-Mutante ^{C938S}Nedd4-2 zeigte wie die inaktive SGK1-Mutante ^{K127N}SGK1 keine signifikante Beeinflussung der SGLT1-Aktivität; unspezifische Effekte z. B. durch Überlastung der Proteinsynthese konnten durch Expression dieser inaktiven Mutanten weitgehend ausgeschlossen werden. ^{S338AS444A}Nedd4-2, eine Nedd4-2-Mutante ohne SGK-Phosphorylierungsstelle, ließ sich in ihrer inhibitorischen Wirkung auf SGLT1 durch SGK1-Koexpression nur abschwächen. Die konstitutiv aktive Form ^{S422D}SGK1 erwies sich als ähnlich wirksam wie Wildtyp-SGK1. SGLT1 wurde auch durch die mit SGK1 verwandten Kinasen SGK3 und ^{T308DS473D}PKB (im Gegensatz zu SGK2 und der inaktiven PKB-Mutante ^{T308AS473A}PKB) stimuliert; die fehlende Aktivierung durch SGK2 wurde in *Western-Blot*-Analysen bestätigt, in denen Nedd4-2 von SGK2 nicht phosphoryliert wurde. Bei Koexpression von SGK3 und ^{T308DS473D}PKB konnte kein additiver stimulierender Effekt auf SGLT1 festgestellt werden. SGLT1 besitzt keine der bislang bekannten für die Nedd4-2-Bindung erforderlichen Aminosäuresequenzen wie z. B. das PY-Motiv. Möglicherweise

erfolgt eine Interaktion über Regulatorproteine wie das den spannungsgesteuerten Kaliumkanal Kv1.3 regulierende Protein KChAP, das eine PY-Sequenz enthält.

Chemilumineszenzuntersuchungen untermauern die oben angeführten Ergebnisse: SGLT1+SGK1-exprimierende Oozyten weisen eine deutlich gesteigerte Expressionsrate von SGLT1 auf, SGLT1+Nedd4-2-exprimierende Zellen eine signifikant reduzierte. Dexamethason steigerte bei Wildtyp-Mäusen im Gegensatz zu SGK1-Knock-out-Mäusen die SGLT1-Expressionsrate. Ussingkammerexperimente wiesen bei SGK3-Knock-out-Mäusen verglichen mit Wildtyp-Mäusen einen geringeren Glukose-induzierten Strom über das Jejunum auf. Der E8CC/CT;I6CC-Polymorphismus im SGK1-Gen ist neben erhöhten Blutdruckwerten mit einem erhöhten *Body-Mass-Index* assoziiert, möglicherweise hervorgerufen durch gesteigerte SGLT1-Expressionsraten. Bei Typ 2-Diabetikern werden erhöhte Proteinkonzentrationen von SGLT1 und GLUT5 in der Bürstensaummembran des Duodenums nachgewiesen.

Der Natrium-Phosphat-Kotransporter NaPi IIb, der wie SGLT1 hauptsächlich im Darm exprimiert wird, konnte in seiner Aktivität durch Nedd4-2 (im Unterschied zur inaktiven Nedd4-2-Mutante ^{C938S}Nedd4-2) gehemmt und durch SGK1, die konstitutiv aktive Mutante ^{S422D}SGK1 sowie SGK3 angeregt werden. SGK2 und ^{T308DS473D}PKB vermochten wie die inaktive Mutante ^{K127N}SGK1 die NaPi IIb-Aktivität nicht zu beeinflussen. Koexpression von ^{S422D}SGK1 bzw. SGK3 mit Nedd4-2 resultierte im Gegensatz zur Koexpression von SGK2 bzw. ^{T308DS473D}PKB mit Nedd4-2 in einer vollständigen Aufhebung des inhibitorischen Nedd4-2-Effekts. Nedd4-2 und ^{S422D}SGK1 bewirkten eine Änderung der maximalen Transportrate V_{max} , während die Affinitätskonstante K_m unbeeinflusst blieb; diese im Rahmen von Kinetikmessungen erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch ^{S422D}SGK1 und Nedd4-2 die Anzahl der Transportermoleküle in der Zellmembran geändert wird und nicht die Aktivität eines einzelnen Transportermoleküls. Von TGF- β ist bekannt, dass er die SGK1-Expression stimuliert; Inkubation von Intestine 407-Zellen mit TGF- β ging einher mit einer gesteigerten SGK1-Expressionsrate und vermehrter

Nedd4-2-Phosphorylierung. NaPi IIb besitzt wie SGLT1 kein PY-Motiv; möglicherweise erfolgt die Regulation des Transporters über ein Intermediärprotein, eventuell findet auch (zusätzlich) eine direkte Phosphorylierung von NaPi IIb durch SGK1 und SGK3 statt.

Der Chloridkanal CIC-2 ließ sich durch SGK1, SGK2, SGK3 und ^{T308DS473D}PKB aktivieren, wobei sich der Effekt von SGK2 als am wenigsten stark ausgeprägt darstellte. Durch Nedd4-2 ließ sich eine Hemmung des CIC-2-Stroms erzielen, die bei Koexpression mit SGK1, ^{S422D}SGK1, SGK2, SGK3 und ^{T308DS473D}PKB reversibel war. Ohne signifikante Wirkung auf CIC-2 blieben die inaktiven Mutanten ^{T308AS473A}PKB und ^{C938S}Nedd4-2. Chemilumineszenzuntersuchungen zeigten bei Koexpression von CIC-2 mit SGK1, SGK3 bzw. PKB eine gesteigerte und bei Koexpression mit Nedd4-2 eine reduzierte CIC-2-Expressionsrate. Über eine solche Regulation durch SGK und/oder Nedd4-2 könnte CIC-2 in die Zellvolumenregulation involviert sein.

CIC-2 besitzt mit einem Serinrest an Position 82 eine mögliche Phosphorylierungsstelle für die SGK; die durch Substitution dieser Aminosäure durch Aspartat (Imitation der phosphorylierten Form) erzeugte Mutante ^{S82D}CIC-2 wies im Unterschied zur Mutante ^{S82A}CIC-2 (keine Phosphorylierungsstelle) signifikant höhere Ströme auf als Wildtyp-CIC-2. Allerdings konnte bei beiden Mutanten durch Koexpression mit ^{S422D}SGK1 eine Zunahme des CIC-2-Stroms bewirkt werden; dies deutet auf einen vermutlich vorhandenen zusätzlichen Regulationsmechanismus hin.

Die oben angegebene CIC-2-Stimulation im Rahmen einer Phosphorylierung durch die SGK-Isoformen steht im Widerspruch zu der Tatsache, dass CIC-2 über eine Serin-/Threonin-Dephosphorylierung durch die Phosphatasen 1 α und 1 β aktiviert wird; zudem ist eine Hemmung von CIC-2 durch Phosphorylierung (katalysiert von der M-Phase-spezifischen Cyclin-abhängigen Kinase p34^{cdc2}/Cyclin B) möglich. Die Diskrepanz zwischen dieser inhibitorischen Wirkung der Phosphatasen 1 α und 1 β bzw. der M-Phase-spezifischen Cyclin-abhängigen Kinase p34^{cdc2}/Cyclin B und einer aktivierenden Wirkung der SGK

könnte durch eine indirekte Stimulation von CIC-2 durch die SGK mittels Phosphorylierung und folglich Inaktivierung von Nedd4-2 erklärt werden.

Sogenannte „PEST-Sequenzen“ (Sequenzen, die viele Prolin-, Glutaminsäure-, Serin- und Threonin-Reste enthalten) scheinen als Signale für nachfolgenden raschen Proteinabbau nach Ubiquitinierung zu fungieren. CIC-2 umfasst 5 dieser PEST-Sequenzen. Zum Ende der M-Phase des Zellzyklus lässt sich eine ausgeprägte Polyubiquitinierung von CIC-2 nachweisen; möglicherweise resultiert hieraus der rasche Abbau der CIC-2-Proteine nach der Zellteilung. Die Ubiquitinierungsrate von CIC-2 kann durch CIC-2-Phosphorylierung durch die oben erwähnte M-Phase-spezifische Cyclin-abhängige Kinase p34^{cdc2}/Cyclin B gesteigert werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Abraham, M. I., McAteer, J. A., Kempson, S. A. (1990).
Insulin stimulates phosphate transport in opossum kidney epithelial cells.
Am. J. Physiol. Renal Physiol. 258(6.2), F1592-1598
2. Ahmed, N., Ramjeesingh, M., Wong, S., Varga, A., Garami, E., Bear, C. E. (2000).
Chloride channel activity of ClC-2 is modified by the actin cytoskeleton.
Biochem. J. 352.3, 789-794
3. Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., Hemmings, B. A. (1996).
Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* 15(23), 6541-6551
4. Alessi, D. R., Cohen, P. (1998).
Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8(1), 55-62
5. Alliston, T. N., Maiyar, A. C., Buse, P., Firestone, G. L., Richards, J. S. (1997).
Follicle stimulating hormone-regulated expression of serum/glucocorticoid-inducible kinase in rat ovarian granulosa cells: a functional role for the Sp1 family in promoter activity. *Mol. Endocrinol.* 11(13), 1934-1949
6. Alliston, T. N., Gonzalez-Robayna, I. J., Buse, P., Firestone, G. L., Richards, J. S. (2000).
Expression and localization of serum/glucocorticoid-induced kinase in the rat ovary: relation to follicular growth and differentiation. *Endocrinology.* 141(1), 385-395
7. Alvarez de la Rosa, D., Zhang, P., Náray-Fejes-Tóth, A., Fejes-Tóth, G., Canessa, C. M. (1999).
The serum and glucocorticoid kinase sgk increases the abundance of epithelial sodium channels in the plasma membrane of *Xenopus* oocytes.
J. Biol. Chem. 274(53), 37834-37839
8. Anan, T., Nagata, Y., Koga, H., Honda, Y., Yabuki, N., Miyamoto, C., Kuwano, A., Matsuda, I., Endo, F., Saya, H., Nakao, M. (1998).
Human ubiquitin-protein ligase Nedd4: expression, subcellular localization and selective interaction with ubiquitin-conjugating enzymes. *Genes Cells.* 3(11), 751-763

9. Argetsinger, L. S., Carter-Su, C. (1996). Mechanism of signaling by growth hormone receptor. *Physiol. Rev.* 76(4), 1089-1107
10. Arima, K., Hines, E. R., Kiela, P. R., Drees, J. B., Collins, J. F., Gishan, F. K. (2002). Glucocorticoid regulation and glycosylation of mouse intestinal type IIb Na-P(i) cotransporter during ontogeny. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283(2), G426-434
11. Arreola, J., Park, K., Melvin, J. E., Begenisich, T. (1996). Three distinct chloride channels control anion movements in rat parotid acinar cells. *J. Physiol.* 490.2, 351-362
12. Babyatsky, M. W., Rossiter, G., Podolsky, D. K. (1996). Expression of transforming growth factors alpha and beta in colonic mucosa in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 110(4), 975-984
13. Bähr, V., Pfeiffer, A. F., Diederich, S. (2002). The metabolic syndrome X and peripheral cortisol synthesis. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* 110(7), 313-318
14. Barnard, E. A., Miledi, R., Sumikawa, K. (1982). Translation of exogenous messenger RNA coding for nicotinic acetylcholine receptors produces functional receptors in *Xenopus* oocytes. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 215(1199), 241-246
15. Beck, L., Karaplis, A. C., Amizuka, N., Hewson, A. S., Ozawa, H., Tenenhouse, H. S. (1998). Targeted inactivation of Npt2 in mice leads to severe renal phosphate wasting, hypercalciuria and skeletal abnormalities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95(9), 5372-5377
16. Bell, L. M., Leong, M. L., Kim, B., Wang, E., Park, J, Hemmings, B. A., Firestone, G. L. (2000). Hyperosmotic stress stimulates promoter activity and regulates cellular utilization of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase (Sgk) by a p38 MAPK-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 275(33), 25262-25272
17. Berndt, T. J., Knox, F. G. (1992). Renal regulation of phosphate excretion. In: Seldin, D. W., Giebisch, G. (eds.). *The kidney: Physiology and pathophysiology.* 2nd ed., Raven Press New York. 2511-2532

18. Berryman, M., Bretscher, A. (2000). Identification of a novel member of the chloride intracellular channel gene family (CLIC5) that associates with the actin cytoskeleton of placental microvilli. *Mol. Biol. Cell.* 11(5), 1509-1521
19. Biondi, R. M., Kieloch, A., Currie, R. A., Deak, M., Alessi, D. R. (2001). The PIF-binding pocket in PDK1 is essential for activation of S6K and SGK, but not PKB. *EMBO J.* 20(16), 4380-4390
20. Birkenhäger, R., Otto, E., Schürmann, M. J., Vollmer, M., Ruf, E. M., Maier-Lutz, I., Beekmann, F., Fekete, A., Omran, H., Feldmann, D., Milford, D. V., Jeck, N., Konrad, M., Landau, D., Knoers, N. V., Antignac, C., Sudbrak, R., Kispert, A., Hildebrandt, F. (2001). Mutation of BSND causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure. *Nat. Genet.* 29(3), 310-314
21. Blaisdell, C. J., Pellettieri, J. P., Loughlin, C. E., Chu, S., Zeitlin, P. L. (1999). Keratinocyte growth factor stimulates CLC-2 expression in primary fetal rat distal lung epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 20(4), 842-847
22. Blaisdell, C. J., Edmonds, R. D., Wang, X. T., Guggino, S., Zeitlin, P. L. (2000). pH-regulated chloride secretion in fetal lung epithelia. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 278(6), L1248-1255
23. Blaisdell, C. J., Morales, M. M., Andrade, A. C., Bamford, P., Wasicko, M., Welling, P. (2004). Inhibition of CLC-2 chloride channel expression interrupts expansion of fetal lung cysts. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 286(2), L420-426
24. Birnir, B., Lee, H. S., Hediger, M. A., Wright, E. M. (1990). Expression and characterization of the intestinal Na⁺/glucose cotransporter in COS-7 cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1048(1), 100-104
25. Böhmer, C., Wagner, C. A., Beck, S., Moschen, I., Melzig, J., Werner, A., Lin, J. T., Lang, F., Wehner, F. (2000). The shrinkage-activated Na⁺ conductance of rat hepatocytes and its possible correlation to rENaC. *Cell. Physiol. Biochem.* 10(4), 187-194
26. Boehmer, C., Henke, G., Schniepp, R., Palmada, M., Rothstein, J. D., Bröer, S., Lang, F. (2003). 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.* 86(5), 1181-1188

27. Bösl, M. R., Stein, V., Hübner, C., Zdebik, A. A., Jordt, S. E., Mukhopadhyay, A. K., Davidoff, M. S., Holstein, A. F., Jentsch, T. J. (2001). Male germ cells and photoreceptors, both depending on close cell-cell interactions, degenerate upon CIC-2 Cl⁻ channel disruption. *EMBO J.* 20(6), 1289-1299
28. Bork, P., Sudol, M. (1994). The WW domain: a signalling site in dystrophin? *Trends Biochem. Sci.* 19(12), 531-533
29. Bouillon, R. (1991). Growth hormone and bone. *Horm. Res.* 36 Suppl. 1, 49-55
30. Brennan, F. E., Fuller, P. J. (2000). Rapid upregulation of serum and glucocorticoid-regulated kinase (sgk) gene expression by corticosteroids in vivo. *Mol. Cell. Endocrinol.* 166(2), 129-136
31. Brunet, A., Park, J., Tran, H., Hu, L. S., Hemmings, B. A., Greenberg, M. E. (2001). Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHRL1 (FOXO3a). *Mol. Cell. Biol.* 21(3), 952-965
32. Busch, A. E., Schuster, A., Waldegger, S., Wagner, C. A., Zempel, G., Broer, S., Biber, J., Murer, H., Lang, F. (1996). Expression of a renal type I sodium/phosphate transporter (NaPi-1) induces a conductance in *Xenopus* oocytes permeable for organic and inorganic anions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93(11), 5347-5351
33. Busch, A. E., Waldegger, S., Murer, H., Lang, F. (1996). The molecules of proximal tubular transport: insights from electrophysiology. *Nephron.* 72(1), 1-8
34. Busjahn, A., Aydin, A., Uhlmann, R., Krasko, C., Bähring, S., Szelestei, T., Feng, Y., Dahm, S., Sharma, A. M., Luft, F. C., Lang, F. (2002). Serum- and glucocorticoid-regulated kinase (SGK1) gene and blood pressure. *Hypertension.* 40(3), 256-260
35. Busjahn, A., Luft, F. C. (2003). Twin studies in the analysis of minor physiological differences between individuals. *Cell. Physiol. Biochem.* 13(1), 51-58

36. Capuano, P., Radanovic, T., Wagner, C. A., Bacic, D., Kato, S., Uchiyama, Y., St.-Arnoud, R., Murer, H., Biber, J. (2005). Intestinal and renal adaptation to a low-P_i diet of type II NaPi cotransporters in vitamin D receptor- and 1 α OHase-deficient mice. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288(2), C429-434
37. Carew, M. A., Thorn, P. (1996). Identification of ClC-2-like chloride currents in pig pancreatic acinar cells. *Pflügers Arch.* 433(1-2), 84-90
38. Caverzasio, J., Bonjour, J. P. (1992). Tyrosine phosphorylation selectively regulates renal cellular phosphate transport. Evidence that it mediates the stimulatory effect of insulin-like growth factor-1. *Endocrinology.* 130(1), 373-380
39. Chen, S. Y., Bhargava, A., Mastroberardino, L., Meijer, O. C., Wang, J., Buse, P., Firestone, G. L., Verrey, F., Pearce, D. (1999). Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96(5), 2514-2519
40. Chen, T. Y., Miller, C. (1996). Nonequilibrium gating and voltage dependence of the ClC-0 Cl⁻ channel. *J. Gen. Physiol.* 108(4), 237-250
41. Cheng, G., Kim, M. J., Jia, G., Agrawal, D. K. (2007). Involvement of chloride channels in IGF-I-induced proliferation of porcine arterial smooth muscle cells. *Cardiovasc. Res.* 73(1), 198-207
42. Chesnoy-Marchais, D., Fritsch, J. (1994). Activation of hyperpolarization and atypical osmosensitivity of a Cl⁻ current in rat osteoblastic cells. *J. Membr. Biol.* 140(3), 173-188
43. Chien, M. L., Foster, J. L., Douglas, J. L., Garcia, J. V. (1997). The amphotropic murine leukemia virus receptor gene encodes a 71-kilodalton protein that is induced by phosphate depletion. *J. Virol.* 71(6), 4564-4570
44. Chu, S., Murray, C. B., Liu, M. M., Zeitlin, P. L. (1996). A short ClC-2 mRNA transcript is produced by exon skipping. *Nucleic Acids Res.* 24(17), 3453-3457
45. Chu, S., Zeitlin, P. L. (1997). Alternative mRNA splice variants of the rat ClC-2 chloride channel gene are expressed in lung: genomic sequence and organization of ClC-2. *Nucleic Acids Res.* 25(20), 4153-4159

46. Cid, L. P., Niemeyer, M. I., Ramírez, A., Sepúlveda, F. V. (2000). Splice variants of a CIC-2 chloride channel with differing functional characteristics. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279(4), C1198-1210
47. Clark, S., Jordt, S. E., Jentsch, T. J., Mathie, A. (1998). Characterization of the hyperpolarization-activated chloride current in dissociated rat sympathetic neurons. *J. Physiol.* 506.3, 665-678
48. Clayton, G. H., Staley, K. J., Wilcox, C. L., Owens, G. C., Smith, R. L. (1998). Developmental expression of CIC-2 in the rat nervous system. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 108(1-2), 307-318
49. Collins, J. F., Ghishan, F. K. (1994). Molecular cloning, functional expression, tissue distribution, and in situ hybridization of the renal sodium phosphate (Na⁺/P_i) transporter in the control and hypophosphatemic mouse. *FASEB J.* 8(11), 862-868
50. Cowling, R. T., Birnboim, H. C. (2000). 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.* 67(2), 240-248
51. Cross, H. S., Debiec, H., Peterlik, M. (1990). Mechanism and regulation of intestinal phosphate absorption. *Miner. Electrolyte Mebab.* 16(2-3), 115-124
52. Cuppoletti, J., Tewari, K. P., Sherry, A. M., Kupert, E. Y., Malinowska, D. H. (2001). CIC-2 Cl⁻ channels in human lung epithelia: activation by arachidonic acid, amidation, and acid-activated omeprazole. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281(1), C46-54
53. Cuppoletti, J., Tewari, K. P., Sherry, A. M., Ferrante, C. J., Malinowska, D. H. (2004). Sites of protein kinase A activation of the human CIC-2 Cl⁻ channel. *J. Biol. Chem.* 279(21), 21849-21856
54. Dai, F., Yu, L., He, H., Zhao, Y., Yang, J., Zhang, X., Zhao S. (1999). Cloning and mapping of a novel human serum/glucocorticoid regulated kinase-like gene, SGKL, to chromosome 8q12.3-q13.1. *Genomics.* 62(1), 95-97
55. Danisi, G., Murer, H. (1991). Inorganic phosphate absorption in small intestine. In: Handbook of physiology. The gastrointestinal system. Intestinal absorption and secretion. Bethesda, M. D.: Am. Physiol. Soc., sect. 6, vol. IV, chapt. 12, 323-336

56. Dascal, N. (1987).
The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 22(4), 317-387
57. Database Services, *elegans C* (online). The Sanger Centre.
<http://www.sanger.ac.uk> (2000 June 21)
58. Davies, S. P., Reddy, H., Caivano, M., Cohen, P. (2000).
Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.* 351.1, 95-105
59. Dawid, I. B., Sargent, T. D. (1988).
Xenopus laevis in developmental and molecular biology. *Science.* 240(4858), 1443-1448
60. de la Horra, C., Hernando, N., Lambert, G., Forster, I., Biber, J., Murer, H. (2000).
Molecular determinants of pH sensitivity of the type IIa Na/P_i cotransporter. *J. Biol. Chem.* 275(9), 6284-6287
61. Debonneville, C., Flores, S. Y., Kamynina, E., Plant, P. J., Tauxe, C., Thomas, M. A., Münster, C., Chraïbi, A., Pratt, J. H., Horisberger, J. D., Pearce, D., Loffing, J., Staub, O. (2001).
Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na⁺ channel cell surface expression. *EMBO J.* 20(24), 7052-7059
62. Delmolino, L. M., Castellot, J. J. Jr. (1997).
Heparin suppresses sgk, an early response gene in proliferating vascular smooth muscle cells. *J. Cell. Physiol.* 173(3), 371-379
63. Dieter, M., Palmada, M., Rajamanickam, J., Aydin, A., Busjahn, A., Boehmer, C., Luft, F.C., Lang, F. (2004).
Regulation of glucose transporter SGLT1 by ubiquitin ligase Nedd4-2 and kinases SGK1, SGK3, and PKB. *Obes. Res.* 12(5), 862-870
64. Dietzel, I. D., Bruns, D., Polder, H.-R., Lux, H. D. (1992).
Voltage clamp recording. In: Kettenmann, H., Grantyn, R. (eds.): Practical electrophysiological methods: A guide for in vitro studies in vertebrate neurobiology. 1st ed., New York. 256-262
65. Díez-Sampedro, A., Eskandari, S., Wright, E. M., Hirayama, B. A. (2001).
Na⁺-to-sugar stoichiometry of SGLT3. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 280(2), F278-282
66. Díez-Sampedro, A., Hirayama, B. A., Osswald, C., Gorboulev, V., Baumgarten, K., Volk, C., Wright, E. M., Koepsell, H. (2003).
A glucose sensor hiding in a family of transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100(20), 11753-11758

67. Dumont, J. N. (1972).
Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* 136(2), 153-179
68. Dunham, I., Shimizu, N., Roe, B. A., Chissoe, S., Hunt, A. R., Collins, J. E., Bruskiewich, R., Beare, D. M., Clamp, M., Smink, L. J., Ainscough, R., Almeida, J. P., Babbage, A., Bagguley, C., Bailey, J., Barlow, K., Bates, K. N., Beasley, O., Bird, C. P., Blakey, S., Bridgeman, A. M., Buck, D., Burgess, J., Burrill, W. D., O'Brien, K.P., et al. (1999).
The DNA sequence of human chromosome 22. *Nature.* 402(6761), 489-495
69. Dyer, J., Wood, I. S., Palejwala, A., Ellis, A., Shirazi-Beechey, S. P. (2002).
Expression of monosaccharide transporters in intestine of diabetic humans. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 282(2), G241-248
70. Elsas, L. J., Rosenberg, L. E. (1969).
Familial renal glycosuria: a genetic reappraisal of hexose transport by kidney and intestine. *J. Clin. Invest.* 48(10), 1845-1854
71. Elvin, C. M., Dixon, N. E., Rosenberg, H. (1986).
Molecular cloning of the phosphate (inorganic) transport (pit) gene of *Escherichia coli* K12. Identification of the pit+ gene product and physical mapping of the pit-gor region of the chromosome. *Mol. Gen. Genet.* 204(3), 477-484
72. Embark, H. M., Böhmer, C., Vallon, V., Luft, F., Lang, F. (2003).
Regulation of KCNE1-dependent K⁺ current by the serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) isoforms. *Pflugers Arch.* 445(5), 601-606
73. Enz, R., Ross, B. J., Cutting, G. R. (1999).
Expression of the voltage-gated chloride channel ClC-2 in rod bipolar cells of the rat retina. *J. Neurosci.* 19(22), 9841-9847
74. Eskandari, S. Wright, E. M., Kreman, M., Starace, D. M., Zampighi, G. A. (1998).
Structural analysis of cloned plasma membrane proteins by freeze-fracture electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95(19), 11235-11240
75. Eskandari, S., Wright, E. M., Loo, D. D. (2005).
Kinetics of the reverse mode of the Na⁺/glucose cotransporter. *J. Membr. Biol.* 204(1), 23-32

76. Estévez, R., Boettger, T., Stein, V., Birkenhäger, R., Otto, E., Hildebrandt, F., Jentsch, T. J. (2001). Barttin is a Cl⁻ channel β -subunit crucial for renal Cl⁻ reabsorption and inner ear K⁺ secretion. *Nature*. 414(6863), 558-561
77. Fahlke, C., Rüdell, R., Mitrovic, N., Zhou, M., George, A. L. Jr. (1995). An aspartic acid residue important for voltage-dependent gating of human muscle chloride channels. *Neuron*. 15(2), 463-472
78. Feild, J. A., Zhang, L., Brun, K. A., Brooks, D. P., Edwards, R. M. (1999). Cloning and functional characterization of a sodium-dependent phosphate transporter expressed in human lung and small intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258(3), 578-582
79. Ferroni, S., Marchini, C., Nobile, M., Rapisarda, C. (1997). Characterization of an inwardly rectifying chloride conductance expressed by cultured rat cortical astrocytes. *Glia*. 21(2), 217-227
80. Fillon, S., Klingel, K., Wärntges, S., Sauter, M., Gabrysch, S., Pestel, S., Tanneur, V., Waldegger, S., Zipfel, A., Viebahn, R., Häussinger, D., Bröer, S., Kandolf, R., Lang, F. (2002). Expression of the serine/threonine kinase hSGK1 in chronic viral hepatitis. *Cell. Physiol. Biochem.* 12(1), 47-54
81. Fire, A. (1999). RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet.* 15(9), 358-363
82. Firestone, G. L., Giampaolo, J. R., O'Keeffe, B. A. (2003). Stimulus-dependent regulation of serum and glucocorticoid inducible protein kinase (SGK) transcription, subcellular localization and enzymatic activity. *Cell. Physiol. Biochem.* 13(1), 1-12
83. Fleet, J. C., Bruns, M. E., Hock, J. M., Wood, R. J. (1994). Growth hormone and parathyroid hormone stimulate intestinal calcium absorption in aged female rats. *Endocrinology*. 134(4), 1755-1760
84. Forster, I. C., Wagner, C. A., Busch, A. E., Lang, F., Biber, J., Hernando, N., Murer, H., Werner, A. (1997). Electrophysiological characterization of the flounder type II Na⁺/Pi cotransporter (NaPi-5) expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Membr. Biol.* 160(1), 9-25
85. Forster, I., Hernando, N., Biber, J., Murer, H. (1998). The voltage dependence of a cloned mammalian renal type II Na⁺/Pi cotransporter (NaPi-2). *J. Gen. Physiol.* 112(1), 1-18

86. Forster, I. C., Loo, D. D., Eskandari, S. (1999). Stoichiometry and Na⁺ binding cooperativity of rat and flounder renal type II Na⁺-P_i cotransporters. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 276(4.2), F644-649
87. Frei, P., Gao, B., Hagenbuch, B., Mate, A., Biber, J., Murer, H., Meier, P. J., Stieger, B. (2005). Identification and localization of sodium-phosphate cotransporters in hepatocytes and cholangiocytes of rat liver. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288(4), G771-778
88. Friedrich, B., Feng, Y., Cohen, P., Risler, T., Vandewalle, A., Bröer, S., Wang, J., Pearce, D., Lang, F. (2003). The serine/threonine kinases SGK2 and SGK3 are potent stimulators of the epithelial Na⁺ channel α,β,γ -ENaC. *Pflugers Arch.* 445(6), 693-696
89. Fritsch, J., Edelman, A. (1996). Modulation of the hyperpolarization-activated Cl⁻ current in human intestinal T84 epithelial cells by phosphorylation. *J. Physiol.* 490.1, 115-128
90. Fritsch, J., Edelman, A. (1997). Osmosensitivity of the hyperpolarization-activated chloride current in human intestinal T84 cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 272(3.1), C778-786
91. Fujita, Y., Kojima, H., Hidaka, H., Fujimiya, M., Kashiwagi, A., Kikkawa, R. (1998). Increased intestinal glucose absorption and postprandial hyperglycaemia at the early step of glucose intolerance in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *Diabetologia.* 41(12), 1459-1466
92. Furukawa, T., Ogura, T., Katayama, Y., Hiraoka, M. (1998). Characteristics of rabbit ClC-2 current expressed in *Xenopus* oocytes and its contribution to volume regulation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 274(2.1), C500-512
93. Furukawa, T., Ogura, T., Zheng, Y. J., Tsuchiya, H., Nakaya, H., Katayama, Y., Inagaki, N. (2002). Phosphorylation and functional regulation of ClC-2 chloride channels expressed in *Xenopus* oocytes by M cyclin-dependent protein kinase. *J. Physiol.* 540.3, 883-893
94. Gamper, N., Fillon, S., Huber, S. M., Feng, Y., Kobayashi, T., Cohen, P., Lang, F. (2002). IGF-1 up-regulates K⁺ channels via PI3-kinase, PDK1 and SGK1. *Pflugers Arch.* 443(4), 625-634

95. Gamper, N., Fillon, S., Feng, Y., Friedrich, B., Lang, P. A., Henke, G., Huber, S. M., Kobayashi, T., Cohen, P., Lang, F. (2002).
K⁺ channel activation by all three isoforms of serum- and glucocorticoid-dependent protein kinase SGK. *Pflugers Arch.* 445(1), 60-66
96. Glahn, R. P., Onsgard, M. J., Tyce, G. M., Chinnow, S. L., Knox, F. G., Dousa, T. P. (1993).
Autocrine/paracrine regulation of renal Na⁺-phosphate cotransport by dopamine. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 264(4.2), F618-622
97. Glorieux, F. H., Marie P. J., Pettifor, J. M., Delvin, E. E. (1980).
Bone response to phosphate salts, ergocalciferol, and calcitriol in hypophosphatemic vitamin D-resistant rickets. *N. Engl. J. Med.* 303(18), 1023-1031
98. Gonzalez-Robayna, I. J., Falender, A. E., Ochsner, S., Firestone, G. L., Richards, J. S. (2000).
Follicle-stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-induced kinase (Sgk): evidence for A kinase-independent signaling by FSH in granulosa cells. *Mol. Endocrinol.* 14(8), 1283-1300
99. Grahammer, F., Henke, G., Sandu, C., Rexhepaj, R., Hussain, A., Friedrich, B., Risler, T., Metzger, M., Just, L., Skutella, T., Wulff, P., Kuhl, D., Lang, F. (2006).
Intestinal function of gene-targeted mice lacking serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 290(6), G1114-1123
100. Gründer, S., Thiemann, A., Pusch, M., Jentsch, T. J. (1992).
Regions involved in the opening of ClC-2 chloride channel by voltage and cell volume. *Nature.* 360(6406), 759-762
101. Gurdon, J. B., Lane, C. D., Woodland, H. R., Marbaix, G. (1971).
Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature.* 233(5316), 177-182
102. Gurdon, J. B., Woodland, H. R. (1975).
In: King, R. C. (ed.). Handbook of genetics. Plenum, New York. 35-44
103. Gurdon, J. B. (1996).
Introductory comments: *Xenopus* as a laboratory animal. In: Tinsley, R., Kobel, H. (eds.). The biology of *Xenopus*. Clarendon press. 3-6
104. Gyömörey, K., Yeger, H., Ackerley, C., Garami, E., Bear, C. E. (2000).
Expression of the chloride channel ClC-2 in the murine small intestine epithelium. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279(6), C1787-1794

105. Hager, K., Hazama, A., Kwon, H. M., Loo, D. D., Handler, J. S., Wright, E. M. (1995). Kinetics and specificity of the renal Na⁺/myo-inositol cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Membr. Biol.* 143(2), 103-113
106. Hammerman, M. R., Rogers, S., Hansen, V. A., Gavin, J. R. 3rd. (1984). Insulin stimulates Pi transport in brush border vesicles from proximal tubular segments. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 247(5.1), E616-624
107. Hammerman, M. R. (1986). Phosphate transport across renal proximal tubular cell membranes. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 251(3.2), F385-398
108. Hammond, T. G., Yusufi, A. N., Knox, F. G., Dousa, T. P. (1985). Administration of atrial natriuretic factor inhibits sodium-coupled transport in proximal tubules. *J. Clin. Invest.* 75(6), 1983-1989
109. Hattenhauer, O., Traebert, M., Murer, H., Biber, J. (1999). Regulation of small intestinal Na-P_i type IIb cotransporter by dietary phosphate intake. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 277(4.1), G756-762
110. Hayashi, M., Tapping, R. I., Chao, T. H., Lo, J. F., King, C. C., Yang, Y., Lee, J. D. (2001). BMK1 mediates growth factor-induced cell proliferation through direct cellular activation of serum and glucocorticoid-inducible kinase. *J. Biol. Chem.* 276(12), 8631-8634
111. Hayes, G., Busch, A., Lötscher, M., Waldegger, S., Lang, F., Verrey, F., Biber, J., Murer, H. (1994). Role of N-linked glycosylation in rat renal NaP_i-cotransport. *J. Biol. Chem.* 269(39), 24143-24149
112. Hediger, M. A., Coady, M. J., Ikeda, T. S., Wright, E. M. (1987). Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose cotransporter. *Nature.* 330(6146), 379-381
113. Hediger, M. A., Turk, E., Wright, E. M. (1989). Homology of the human intestinal Na⁺/glucose and *Escherichia coli* Na⁺/proline cotransporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86(15), 5748-5752
114. Hediger, M. A., Budarf, M. L., Emanuel, B. S., Mohandas, T. K., Wright, E. M. (1989). Assignment of the human intestinal Na⁺/glucose cotransporter gene (SGLT1) to the q11.2 → qter region of chromosome 22. *Genomics.* 4(3), 297-300

115. Henry, P. C., Kanelis, V., O'Brien, M. C., Kim, B., Gautschi, I., Forman-Kay, J., Schild, L., Rotin, D. (2003).
Affinity and specificity of interactions between Nedd4 isoforms and the epithelial Na⁺ channel. *J. Biol. Chem.* 278(22), 20019-20028
116. Hildmann, B., Storelli, C., Danisi, G., Murer, H. (1982).
Regulation of Na⁺-P_i cotransport by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in rabbit duodenal brush-border membranes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 242(5), G533-539
117. Hilfiker, H., Hattenhauer, O., Traebert, M., Forster, I., Murer, H., Biber, J. (1998).
Characterization of a murine type II sodium-phosphate cotransporter expressed in mammalian small intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95(24), 14564-14569
118. Hill, M. M., Clark, S. F., Tucker, D. F., Birnbaum, M. J., James, D. E., Macaulay, S. L. (1999).
A role for protein kinase Bbeta/Akt2 in insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* 19(11), 7771-7781
119. Hille, B. (1992).
Ionic channels of excitable membranes. 2nd ed., Sunderland, Massachusetts
120. Hirayama, B. A., Lostao, M. P., Panayotova-Heiermann, M., Loo, D. D., Turk, E., Wright, E. M. (1996).
Kinetic and specificity differences between rat, human, and rabbit Na⁺-glucose cotransporters (SGLT-1). *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 270(6.1), G919-926
121. Hirayama, B. A., Loo, D. D., Wright, E. M. (1997).
Cation effects on protein conformation and transport in the Na⁺/glucose cotransporter. *J. Biol. Chem.* 272(4), 2110-2115
122. Hisano, S., Haga, H., Li, Z., Tatsumi, S., Miyamoto, K. I., Takeda, E., Fukui, Y. (1997).
Immunohistochemical and RT-PCR detection of Na⁺-dependent inorganic phosphate cotransporter (NaPi-2) in rat brain. *Brain Res.* 772(1-2), 149-155
123. Horowitz, B, Tsung, S. S., Hart, P., Levesque, P. C., Hume, J. R. (1993).
Alternative splicing of CFTR Cl⁻ channels in heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 264(6.2), H2214-2220

124. Huibregtse, J. M., Scheffner, M., Beaudenon, S., Howley, P. M. (1995). A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92(11), 5249[erratum] et 92(7), 2563-2567
125. Imaizumi, K., Tsuda, M., Wanaka, A., Tohyama, M., Takagi, T. (1994). Differential expression of sgk mRNA, a member of the Ser/Thr protein kinase gene family, in rat brain after CNS injury. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 26(1-2), 189-196
126. Iyer, V. R., Eisen, M. B., Ross, D. T., Schuler, G., Moore, T., Lee, J. C., Trent, J. M., Staudt, L. M., Hudson, J. Jr., Boguski, M. S., Lashkari, D., Shalon, D., Botstein, D., Brown, P. O. (1999). The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science.* 283(5398), 83-87
127. Jentsch, T. J., Steinmeyer, K., Schwarz, G. (1990). Primary structure of Torpedo marmorata chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus oocytes*. *Nature.* 348(6301), 510-514
128. Jentsch, T. J., Günther, W., Pusch, M., Schwappach, B. (1995). Properties of voltage-gated chloride channels of the ClC gene family. *J. Physiol.* 482, 19S-25S
129. Jentsch, T. J., Stein, V., Weinreich, F., Zdebik, A. A. (2002). Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol. Rev.* 82(2), 503-568
130. Jeyaraj, S., Boehmer, C., Lang, F., Palmada, M. (2007). Role of SGK1 kinase in regulating glucose transport via glucose transporter GLUT4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356(3), 629-635
131. Johann, S. V., Gibbons, J. J., O'Hara, B. (1992). GLVR1, a receptor for gibbon ape leukemia virus, is homologous to a phosphate permease of *Neurospora crassa* and is expressed at high levels in the brain and thymus. *J. Virol.* 66(3), 1635-1640
132. Jolliffe, C. N., Harvey, K. F., Haines, B. P., Parasivam, G., Kumar, S. (2000). Identification of multiple proteins expressed in murine embryos as binding partners for the WW domains of the ubiquitin-protein ligase Nedd4. *Biochem. J.* 351.3, 557-565
133. Jordt, S., E., Jentsch, T. J. (1997). Molecular dissection of gating in the ClC-2 chloride channel. *EMBO J.* 16(7), 1582-1592

134. Jung, H., Rübenhagen, R., Tebbe, S., Leifker, K., Tholema, N., Quick, M., Schmid, R. (1998).
Topology of the Na⁺/proline transporter of Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* 273(41), 26400-26407
135. Kajita, H., Brown, P. D. (1997).
Inhibition of the inward-rectifying Cl⁻ channel in rat choroid plexus by a decrease in extracellular pH. *J. Physiol.* 498.3, 703-707
136. Kajita, H., Omori, K., Matsuda, H. (2000).
The chloride channel ClC-2 contributes to the inwardly rectifying Cl⁻ conductance in cultured porcine choroid plexus epithelial cells. *J. Physiol.* 523.2, 313-324
137. Kanai, Y., Lee, W. S., You, G., Brown, D., Hediger, M. A. (1994).
The human kidney low affinity Na⁺/glucose cotransporter SGLT2. Delineation of the major renal reabsorptive mechanism for D-glucose. *J. Clin. Invest.* 93(1), 397-404
138. Kanelis, V., Rotin, D., Forman-Kay, J. D. (2001).
Solution structure of a Nedd4 WW domain-ENaC peptide complex. *Nat. Struct. Biol.* 8(5), 407-412
139. Karim-Jimenez, Z., Hernando, N., Biber, J., Murer, H. (2000).
Requirement of a leucine residue for (apical) membrane expression of type IIb NaPi cotransporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97(6), 2916-2921
140. Katai, K., Miyamoto, K., Kishida, S., Segawa, H., Nii, T., Tanaka, H., Tani, Y., Arai, H., Tatsumi, S., Morita, K., Taketani, Y., Takeda, E. (1999).
Regulation of intestinal Na⁺-dependent phosphate co-transporters by a low-phosphate diet and 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Biochem. J.* 343.3, 705-712
141. Kavanaugh, M. P., Miller, D. G., Zhang, W., Law, W., Kozak, S. L., Kabat, D., Miller, A. D. (1994).
Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91(15), 7071-7075
142. Kavanaugh, M. P., Kabat, D. (1996).
Identification and characterization of a widely expressed phosphate transporter/retrovirus receptor family. *Kidney Int.* 49(4), 959-963
143. Kayne, L. H., Pham, P. C., Pham, P. T., Lee, D. B. N. (2001).
Intestinal absorption of phosphate. In: Massry, S. G., Glasscock, R. J. (eds.). *Textbook of nephrology*. 4th ed. 355-362

144. Klingel, K., Wärtges, S., Bock, J., Wagner, C. A., Sauter, M., Waldegger, S., Kandolf, R., Lang, F. (2000).
Expression of cell volume-regulated kinase h-sgk in pancreatic tissue. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279(5), G998-1002
145. Knochel, J. P. (1992).
The clinical and physiological implications of phosphorus deficiency. In: Seldin, D. W., Giebisch, G. (eds.). *The kidney: Physiology and pathophysiology*. 2nd ed., Raven Press New York. 2533-2562
146. Kobayashi, T., Cohen, P. (1999).
Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositide 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2. *Biochem. J.* 339.2, 319-328
147. Kobayashi, T., Deak, M., Morrice, N., Cohen, P. (1999).
Characterization of the structure and regulation of two novel isoforms of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase. *Biochem. J.* 344.1, 189-197
148. Koch, M. C., Steinmeyer, K., Lorenz, C., Ricker, K., Wolf, F., Otto, M., Zoll, B., Lehmann-Horn, F., Grzeschik, K. H., Jentsch, T. J. (1992).
The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science.* 257(5071), 797-800
149. Kohl, B., Wagner, C. A., Huelseweh, B., Busch, A. E., Werner, A. (1998).
The Na⁺-phosphate cotransport system (NaPi-II) with a cleaved protein backbone: implications on function and membrane insertion. *J. Physiol.* 508.2, 341-350
150. Komwatana, P., Dinudom, A., Young, J. A., Cook, D. I. (1994).
Characterization of the Cl⁻ conductance in the granular duct cells of mouse mandibular glands. *Pflugers Arch.* 428(5-6), 641-647
151. Kong, C. T., Yet, S. F., Lever, J. E. (1993).
Cloning and expression of a mammalian Na⁺/amino acid cotransporter with sequence similarity to Na⁺/glucose cotransporters. *J. Biol. Chem.* 268(3), 1509-1512
152. Kristiansen, S., Nielsen, J. N., Bourgoin, S., Klip, A., Franco, M., Richter, E. A. (2001).
GLUT-4 translocation in skeletal muscle studied with a cell-free assay: involvement of phospholipase D. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281(3), E608-618

153. Kumar, S., Tomooka, Y., Noda, M. (1992). Identification of a set of genes with developmentally down-regulated expression in the mouse brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185(3), 1155-1161
154. Kumar, J. M., Brooks, D. P., Olson, B. A., Laping, N. J. (1999). Sgk, a putative serine/threonine kinase, is differentially expressed in the kidney of diabetic mice and humans. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10(12), 2488-2494
155. Kuryshev, Y. A., Wible, B. A., Gudz, T. I., Ramirez, A. N., Brown, A. M. (2001). KChAP/Kv β 1.2 interactions and their effects on cardiac Kv channel expression. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281(1), C290-299
156. Lambert, G., Traebert, M., Hernando, N., Biber, J., Murer, H. (1999). Studies on the topology of the renal type II NaPi-cotransporter. *Pflugers Arch.* 437(6), 972-978
157. Landry, D., Sullivan, S., Nicolaidis, M., Redhead, C., Edelman, A., Field, M., al-Awqati, Q., Edwards, J. (1993). Molecular cloning and characterization of p64, a chloride channel protein from kidney microsomes. *J. Biol. Chem.* 268(20), 14948-14955
158. Lang, F. (1980). Renal handling of calcium and phosphate. *Klin. Wochenschr.* 58(19), 985-1003
159. 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., Broër, S. (2000). Deranged transcriptional regulation of cell-volume-sensitive kinase hSGK in diabetic nephropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97(14), 8157-8162
160. Lang, F., Cohen, P. (2001). Regulation and physiological roles of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase isoforms. *Sci. STKE.* 2001(108), RE17
161. Lang, F., Henke, G., Embark, H. M., Waldegger, S., Palmada, M., Böhmer, C., Vallon, V. (2003). Regulation of channels by the serum and glucocorticoid-inducible kinase – implications for transport, excitability and cell proliferation. *Cell. Physiol. Biochem.* 13(1), 41-50
162. Law, F., Rizzoli, R., Bonjour, J. P. (1993). Transforming growth factor- β inhibits phosphate transport in renal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 264(4.2), F623-628

163. Lee, D. B., Walling, M. W., Brautbar, N. (1986).
Intestinal phosphate absorption: influence of vitamin D and non-vitamin D factors. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 250(3.1), G369-373
164. Lehmann-Horn, F., Jurkat-Rott, K. (1999).
Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiol. Rev.* 79(4), 1317-1372
165. Leong, M. L., Maiyar, A. C., Kim, B., O'Keeffe, B. A., Firestone, G. L. (2003).
Expression of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase, Sgk, is a cell survival response to multiple types of environmental stress stimuli in mammary epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 278(8), 5871-5882
166. Leung, D. W., Loo, D. D., Hirayama, B. A., Zeuthen, T., Wright, E. M. (2000).
Urea transport by cotransporters. *J. Physiol.* 528.2, 251-257
167. Levy, O., De la Vieja, A., Ginter, C. S., Riedel, C., Dai, G., Carrasco, N. (1998).
N-linked glycosylation of the thyroid Na⁺/I⁻ symporter (NIS). Implications for its secondary structure model. *J. Biol. Chem.* 273(35), 22657-22663
168. Li, H., Ren, P., Onwochei, M., Ruch, R. J., Xie, Z. (1996).
Regulation of rat Na⁺/P_i cotransporter-1 gene expression: the roles of glucose and insulin. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 271(6.1), E1021-1028
169. Lin, C. W., Chen, T. Y. (2000).
Cysteine modification of a putative pore residue in ClC-0: implication for the pore stoichiometry of ClC chloride channels. *J. Gen. Physiol.* 116(4), 535-546
170. Lipecka, J., Bali, M., Thomas, A., Fanen, P., Edelman, A., Fritsch, J. (2002).
Distribution of ClC-2 chloride channel in rat and human epithelial tissues. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282(4), C805-816
171. Liu, D., Yang, X., Songyang, Z. (2000).
Identification of ClSK, a new member of the SGK kinase family that promotes IL-3-dependent survival. *Curr. Biol.* 10(19), 1233-1236
172. Loewen, M. E., MacDonald, D. W., Gaspar, K. J., Forsyth, G. W. (2000).
Isoform-specific exon skipping in a variant form of ClC-2. *Biochim. Biophys. Acta.* 1493(1-2), 284-288

173. Lolkema, J. S., Speelmans, G., Konings, W. N. (1994). Na⁺-coupled versus H⁺-coupled energy transduction in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1187(2), 211-215
174. Loo, D. D., Zeuthen, T., Chandy, G., Wright, E. M. (1996). Cotransport of water by the Na⁺/glucose cotransporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93(23), 13367-13370
175. Loo, D. D., Hirayama, B. A., Meinild, A. K., Chandy, G., Zeuthen, Z., Wright, E. M. (1999). Passive water and ion transport by cotransporters. *J. Physiol.* 518.1, 195-202
176. Loo, D. D., Wright, E. M., Zeuthen, T. (2002). Water pumps. *J. Physiol.* 542.1, 53-60
177. Ludewig, U., Pusch, M., Jentsch, T. J. (1996). Two physically distinct pores in the dimeric ClC-0 chloride channel. *Nature.* 383(6598), 340-343
178. Ludewig, U., Jentsch, T. J., Pusch, M. (1997). Inward rectification in ClC-0 chloride channels caused by mutations in several protein regions. *J. Gen. Physiol.* 110(2), 165-171
179. Mackenzie, B., Panayotova-Heiermann, M., Loo, D. D., Lever, J. E., Wright, E. M. (1994). SAAT1 is a low affinity Na⁺/glucose cotransporter and not an amino acid transporter. A reinterpretation. *J. Biol. Chem.* 269(36), 22488-22491
180. Mackenzie, B., Loo, D. D., Panayotova-Heiermann, M., Wright, E. M. (1996). Biophysical characteristics of the pig kidney Na⁺/glucose cotransporter SGLT2 reveal a common mechanism for SGLT1 and SGLT2. *J. Biol. Chem.* 271(51), 32678-32683
181. Mackenzie, B., Loo, D. D., Wright, E. M. (1998). Relationships between Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) currents and fluxes. *J. Membr. Biol.* 162(2), 101-106
182. Magagnin, S., Werner, A., Markovich, D., Sorribas, V., Biber, J., Murer, H. (1993). Expression cloning of human and rat renal cortex Na/P_i cotransport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90(13), 5979-5983
183. Malinowska, D. H., Kupert, E. Y., Bahinski, A., Sherry, A. M., Cuppoletti, J. (1995). Cloning, functional expression, and characterization of a PKA-activated gastric Cl⁻ channel. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 268(1.1), C191-200

184. Martin, K. J., McConkey, C. L., Baldassare, J. J., Jacob, A. K. (1994). Effect of triamcinolone on parathyroid hormone-stimulated second messenger systems and phosphate transport in opossum kidney cells. *Endocrinology*. 134(1), 331-336
185. Martinez, P., Persson, B. L. (1998). Identification, cloning and characterization of a derepressible Na⁺-coupled phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 258(6), 628-638
186. Matsumura, Y., Uchida, S., Kondo, Y., Miyazaki, H., Ko, S. B., Hayama, A., Morimoto, T., Liu, W., Arisawa, M., Sasaki, S., Marumo, F. (1999). Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the CLC-K1 chloride channel. *Nat. Genet.* 21(1), 95-98
187. Meinild, A., Klaerke, D. A., Loo, D. D., Wright, E. M., Zeuthen, T. (1998). The human Na⁺-glucose cotransporter is a molecular water pump. *J. Physiol.* 508.1, 15-21
188. Meyer-Kleine, C., Steinmeyer, K., Ricker, K., Jentsch, T. J., Koch, M. C. (1995). Spectrum of mutations in the major human skeletal muscle chloride channel gene (CLCN1) leading to myotonia. *Am. J. Hum. Genet.* 57(6), 1325-1334
189. Middleton, R. E., Pheasant, D. J., Miller, C. (1996). Homodimeric architecture of a ClC-type chloride ion channel. *Nature*. 383(6598), 337-340
190. Mikosz, C. A., Brickley, D. R., Sharkey, M. S., Moran, T. W., Conzen, S. D. (2001). Glucocorticoid receptor-mediated protection from apoptosis is associated with induction of the serine/threonine survival kinase gene, sgk-1. *J. Biol. Chem.* 276(20), 16649-16654
191. Miles, R. (1999). Neurobiology. A homeostatic switch. *Nature*. 397(6716), 215-216
192. Mindell, J. A., Maduke, M., Miller, C., Grigorieff, N. (2001). Projection structure of a ClC-type chloride channel at 6.5 Å resolution. *Nature*. 409(6817), 219-223
193. Miyamoto, K., Tatsumi, S., Sonoda, T., Yamamoto, H., Minami, H., Taketani, Y., Takeda, E. (1995). Cloning and functional expression of a Na⁺-dependent phosphate co-transporter from human kidney: cDNA cloning and functional expression. *Biochem. J.* 305.1, 81-85

194. Mizuno, H., Nishida, E. (2001).
The ERK MAP kinase pathway mediates induction of SGK (serum- and glucocorticoid-inducible kinase) by growth factors. *Genes Cells*. 6(3), 261-268
195. Moyer, B. D., Denton, J., Karlson, K. H., Reynolds, D., Wang, S., Mickle, J. E., Milewski, M., Cutting, G. R., Guggino, W. B., Li, M., Stanton, B. A. (1999).
A PDZ-interacting domain in CFTR is an apical membrane polarization signal. *J. Clin. Invest.* 104(10), 1353-1361
196. Muff, R., Fischer, J. A., Biber, J., Murer, H. (1992).
Parathyroid hormone receptors in control of proximal tubule function. *Annu. Rev. Physiol.* 54, 67-79
197. Mulrone, S. E., Woda, C. B., Halaihel, N., Louie, B., McDonnell, K., Schulkin, J., Haramati, A., Levi, M. (2004).
Central control of renal sodium-phosphate (NaPi-2) transporters. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 286(4), F647-652
198. Murer, H., Biber, J. (1992).
Renal tubular phosphate transport. Cellular mechanisms. In: Seldin, D. W., Giebisch, G. (eds.). *The kidney: Physiology and pathophysiology*. 2nd ed., Raven Press New York. 2481-2509
199. Murer, H., Biber, J. (1996).
Molecular mechanisms of renal apical Na/phosphate cotransport. *Annu. Rev. Physiol.* 58, 607-618
200. Murer, H., Forster, I., Hernando, N., Lambert, G., Traebert, M., Biber, J. (1999).
Posttranscriptional regulation of the proximal tubule NaPi-II transporter in response to PTH and dietary P_i. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 277(5.2), F676-684
201. Murer, H., Hernando, N., Forster, L., Biber, J. (2001).
Molecular mechanisms in proximal tubular and small intestinal phosphate reabsorption (plenary lecture). *Mol. Membr. Biol.* 18(1), 3-11
202. Murray, C. B., Morales, M. M., Flotte, T. R., McGrath-Morrow, S. A., Guggino, W. B., Zeitlin, P. L. (1995).
ClC-2: a developmentally dependent chloride channel expressed in the fetal lung and downregulated after birth. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 12(6), 597-604
203. Murray, C. B., Chu, S., Zeitlin, P. L. (1996).
Gestational and tissue-specific regulation of ClC-2 chloride channel expression. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 271(5.1), L829-837

204. Nagel, G., Hwang, T. C., Nastiuk, K. L., Nairn, A. C., Gadsby, D. C. (1992).
The protein kinase A-regulated cardiac Cl⁻ channel resembles the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature*. 360(6399), 81-84
205. Nalbant, P., Boehmer, C., Dehmelt, L., Wehner, F., Werner, A. (1999).
Functional characterization of a Na⁺-phosphate cotransporter (NaP_i-II) from zebrafish and identification of related transcripts. *J. Physiol.* 520.1, 79-89
206. Náray-Fejes-Tóth, A., Canessa, C., Cleaveland, E. S., Aldrich, G., Fejes-Tóth, G. (1999).
Sgk is an aldosterone-induced kinase in the renal collecting duct. Effects on epithelial Na⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 274(24), 16973-16978
207. Náray-Fejes-Tóth, A., Fejes-Tóth, G. (2000).
The sgk, an aldosterone-induced gene in mineralocorticoid target cells, regulates the epithelial sodium channel. *Kidney Int.* 57(4), 1290-1294
208. Nobile, M., Pusch, M., Rapisarda, C., Ferroni, S. (2000).
Single-channel analysis of a ClC-2-like chloride conductance in cultured rat cortical astrocytes. *FEBS Lett.* 479(1-2), 10-14
209. Noulin, J. F., Fayolle-Julien, E., Desaphy, J. F., Poindessault, J. P., Joffre, M. (1996).
Swelling and cAMP on hyperpolarization-activated Cl⁻ conductance in rat Leydig cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 271(1.1), C74-84
210. O'Connor, C. M., Smith, D. L. (1976).
Inhibition of oocyte maturation by theophylline: Possible mechanism of action. *Dev. Biol.* 52, 318-322
211. Ohlemeyer, C., Meyer, J. W. (1992).
The faraday cage and grounding arrangements. In: Gatyn, R., Kettenmann, H. (eds.). *Practical electrophysiological methods: A guide for in vitro studies in vertebrate neurobiology*. 1st ed., New York. 3-5
212. Ohtani, H., Kagaya, H., Nagura, H. (1995).
Immunohistochemical localization of transforming growth factor-β receptors I and II in inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol.* 30(8), 76-77
213. O'Malley, D., Reimann, F., Simpson, A. K., Gribble, F. M. (2006).
Sodium-coupled glucose cotransporters contribute to hypothalamic glucose sensing. *Diabetes.* 55(12), 3381-3386

214. Pajor, A. M., Wright, E. M. (1992). Cloning and functional expression of a mammalian Na⁺/nucleoside cotransporter. A member of the SGLT family. *J. Biol. Chem.* 267(6), 3557-3560
215. Palmada, M., Dieter, M., Boehmer, C., Waldegger, S., Lang, F. (2004). Serum and glucocorticoid inducible kinases functionally regulate ClC-2 channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321(4), 1001-1006
216. Palmada, M., Dieter, M., Speil, A., Böhmer, C., Mack, A. F., Wagner, H. J., Klingel, K., Kandolf, R., Murer, H., Biber, J., Closs, E. I., Lang, F. (2004). Regulation of intestinal phosphate cotransporter NaPi IIb by ubiquitin ligase Nedd4-2 and by serum- and glucocorticoid-dependent kinase 1. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287(1), G143-150
217. Palmada, M., Boehmer, C., Akel, A., Rajamanickam, J., Jeyaraj, S., Keller, K., Lang, F. (2006). SGK1 kinase upregulates GLUT1 activity and plasma membrane expression. *Diabetes.* 55(2), 421-427
218. Palmer, G., Guicheux, J., Bonjour, J. P., Caverzasio, J. (2000). Transforming growth factor- β stimulates inorganic phosphate transport and expression of the type III phosphate transporter Glvr-1 in chondrogenic ATDC5 cells. *Endocrinology.* 141(6), 2236-2243
219. Paquin, J., Vincent, E., Dugré, A., Xiao, Y., Boyer, C. J., Béliveau, R. (1999). Membrane topography of the renal phosphate carrier NaPi-2: limited proteolysis studies. *Biochim. Biophys. Acta.* 1431(2), 315-328
220. Park, K., Arreola, J., Begenisich, T., Melvin, J. E. (1998). Comparison of voltage-activated Cl⁻ channels in rat parotid acinar cells with ClC-2 in a mammalian expression system. *J. Membr. Biol.* 163(2), 87-95
221. Park, J., Leong, M. L., Buse, P., Maiyar, A. C., Firestone, G. L., Hemmings, B. A. (1999). Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway. *EMBO J.* 18(11), 3024-3033
222. Pearce, D. (2003). SGK1 regulation of epithelial sodium transport. *Cell. Physiol. Biochem.* 13(1), 13-20
223. Perrotti, N., He, R. A., Phillips, S. A., Haft, C. R., Taylor, S. I. (2001). Activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase (Sgk) by cyclic AMP and insulin. *J. Biol. Chem.* 276(12), 9406-9412

224. Persson, B. L., Petersson, J., Fristedt, U., Weinander, R., Berhe, A, Pattison, J. (1999).
Phosphate permeases of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and regulation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1422(3), 255-272
225. Pickart, C. M. (2001).
Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 503-533
226. Piwon, N., Günther, W., Schwake, M., Bösl, M. R., Jentsch, T. J. (2000).
ClC-5 Cl⁻-channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. *Nature.* 408(6810), 369-373
227. Plant, P. J., Yeger, H., Staub, O., Howard, P., Rotin, D. (1997).
The C2 domain of the ubiquitin protein ligase Nedd4 mediates Ca²⁺-dependent plasma membrane localization. *J. Biol. Chem.* 272(51), 32329-32336
228. Plant, P. J., Lafont, F., Lecat, S., Verkade, P., Simons, K., Rotin, D. (2000).
Apical membrane targeting of Nedd4 is mediated by an association of its C2 domain with annexin XIIIb. *J. Cell Biol.* 149(7), 1473-1484
229. Plassart-Schiess, E., Gervais, A., Eymard, B., Laguëny, A., Pouget, J., Warter, J. M., Fardeau, M., Jentsch, T. J., Fontaine, B. (1998).
Novel muscle chloride channel (CLCN1) mutations in myotonia congenita with various modes of inheritance including incomplete dominance and penetrance. *Neurology.* 50(4), 1176-1179
230. Pollard, T. D., Earnshaw, W. C. (2002).
Cell Biology. Philadelphia, Elsevier Science
231. Pusch, M., Jentsch, T. J. (1994).
Molecular physiology of voltage-gated chloride channels. *Physiol. Rev.* 74(4), 813-827
232. Pusch, M., Ludewig, U., Rehfeldt, A., Jentsch, T. J. (1995).
Gating of the voltage-dependent chloride channel ClC-0 by the permeant anion. *Nature.* 373(6514), 527-531
233. Pusch, M., Jordt, S. E., Stein, V., Jentsch, T. J. (1999).
Chloride dependence of hyperpolarization-activated chloride channel gates. *J. Physiol.* 515.2, 341-353
234. Qian, Z., Okuhara, D., Abe, M. K., Rosner, M. R. (1999).
Molecular cloning and characterization of a mitogen-activated protein kinase-associated intracellular chloride channel. *J. Biol. Chem.* 274(3), 1621-1627

235. Quamme, G. A., Shapiro, R. J. (1987).
Membrane controls of epithelial phosphate transport. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65(3), 275-286
236. Quick, M., Tomasevic, J., Wright, E. M. (2003).
Functional asymmetry of the human Na⁺/glucose transporter (hSGLT1) in bacterial membrane vesicles. *Biochemistry.* 42(30), 9147-9152
237. Radanovic, T., Wagner, C. A., Murer, H., Biber, J. (2005).
Regulation of intestinal phosphate transport. I. Segmental expression and adaptation to low-P_i diet of the type IIb Na⁺-P_i cotransporter in mouse small intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288(3), G496-500
238. Ramjeesingh, M., Li, C., Huan, L. J., Garami, E., Wang, Y., Bear, C. E. (2000).
Quaternary structure of the chloride channel ClC-2. *Biochemistry.* 39(45), 13838-13847
239. Rechsteiner, M., Rogers, S. W. (1996).
PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* 21(7), 267-271
240. Richards, J. S., Fitzpatrick, S. L., Clemens, J. W., Morris, J. K., Alliston, T., Sirois, J. (1995).
Ovarian cell differentiation: a cascade of multiple hormones, cellular signals, and regulated genes. *Recent Prog. Horm. Res.* 50, 223-254
241. Richards, J. S., Sharma, S. C., Falender, A. E., Lo, Y. H. (2002).
Expression of FKHR, FKHL1, and AFX genes in the rodent ovary: evidence for regulation by IGF-I, estrogen, and the gonadotropins. *Mol. Endocrinol.* 16(3), 580-599
242. Robinson, K. R. (1979).
Electrical currents through full-grown and maturing *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76(2), 837-841
243. Roth, J. L., Mobarhan, S., Clohisy, M. (2002).
The Metabolic Syndrome: where are we and where do we go? *Nutr. Rev.* 60(10.1), 335-337
244. Rotin, D., Staub, O., Haguenaer-Tsapis, R. (2000).
Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. *J. Membr. Biol.* 176(1), 1-17

245. Rugtveit, J., Nilsen, E. M., Bakka, A., Carlsen, H., Brandtzaeg, P., Scott, H. (1997).
Cytokine profiles differ in newly recruited and resident subsets of mucosal macrophages from inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 112(5), 1493-1505
246. Rutledge, E., Denton, J., Strange, K. (2002).
Cell cycle- and swelling-induced activation of a *Caenorhabditis elegans* CIC channel is mediated by CeGLC-7 α/β phosphatases. *J. Cell Biol.* 158(3), 435-444
247. Rychkov, G. Y., Pusch, M., Roberts, M. L., Jentsch, T. J., Bretag, A. H. (1998).
Permeation and block of the skeletal muscle chloride channel, CIC-1, by foreign anions. *J. Gen. Physiol.* 111(5), 653-665
248. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Manil, J. (1989).
Molecular cloning: A laboratory manual. In: Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (eds.). 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
249. Sandu, C., Rexhepaj, R., Grahammer, F., McCormick, J. A., Henke, G., Palmada, M., Nammi, S., Lang, U., Metzger, M., Just, L., Skutella, T., Dawson, K., Wang, J., Pearce, D., Lang, F. (2005).
Decreased intestinal glucose transport in the *sgk3*-knockout mouse. *Pflugers Arch.* 451(3), 437-444
250. Saviane, C., Conti, F., Pusch, M. (1999).
The muscle chloride channel CIC-1 has a double-barreled appearance that is differentially affected in dominant and recessive myotonia. *J. Gen. Physiol.* 113(3), 457-468
251. Scheinman, S. J. (1998).
X-linked hypercalciuric nephrolithiasis: clinical syndromes and chloride channel mutations. *Kidney Int.* 53(1), 3-17
252. Schild, L., Lu, Y., Gautschi, I., Schneeberger, E., Lifton, R. P., Rossier, B. C. (1996).
Identification of a PY motif in the epithelial Na channel subunits as a target sequence for mutations causing channel activation found in Liddle syndrome. *EMBO J.* 15(10), 2381-2387
253. Schniepp, R., Kohler, K., Ladewig, T., Guenther, E., Henke, G., Palmada, M., Boehmer, C., Rothstein, J. D., Bröer, S., Lang, F. (2004).
Retinal colocalization and in vitro interaction of the glutamate transporter EAAT3 and the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 [correction]. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45(5), 1442-1449

254. Schwake, M., Friedrich, T., Jentsch, T. J. (2001).
An internalization signal in ClC-5, an endosomal Cl⁻ channel mutated in dent's disease. *J. Biol. Chem.* 276(15), 12049-12054
255. Schwiebert, E. M., Cid-Soto, L. P., Stafford, D., Carter, M., Blaisdell, C. J., Zeitlin, P. L., Guggino, W. B., Cutting, G. R. (1998).
Analysis of ClC-2 channels as an alternative pathway for chloride conduction in cystic fibrosis airway cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95(7), 3879-3884
256. Segel, I. H. (1976).
Biochemical calculations. How to solve mathematical problems in general biochemistry. 2nd ed. John Wiley & Sons. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore
257. Setiawan, I., Henke, G., Feng, Y., Böhmer, C., Vasilets, L. A., Schwarz, W., Lang, F. (2002).
Stimulation of Xenopus oocyte Na⁺,K⁺ATPase by the serum and glucocorticoid-dependent kinase sgk1. *Pflugers Arch.* 444(3), 426-431
258. Sherry, A. M., Stroffekova, K., Knapp, L. M., Kupert, E. Y., Cuppoletti, J., Malinowska, D. H. (1997).
Characterization of the human pH- and PKA-activated ClC-2G(2 alpha) Cl⁻ channel. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 273(2.1), C384-393
259. Shigaev, A., Asher, C., Latter, H., Garty, H., Reuveny, E. (2000).
Regulation of sgk by aldosterone and its effects on the epithelial Na⁺ channel. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 278(4), F613-619
260. Shirazi-Beechey, S. P., Penny, J. I., Dyer, J., Wood, I. S., Tarpey, P. S., Scott, D., Buchan, W. (1996).
Epithelial phosphate transport in ruminants, mechanisms and regulation. *Kidney Int.* 49(4), 992-996
261. Short, D. B., Trotter, K. W., Reczek, D., Kreda, S. M., Bretscher, A., Boucher, R. C., Stutts, M. J., Milgram, S. L. (1998).
An apical PDZ protein anchors the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 273(31), 19797-19801
262. Sík, A., Smith, R. L., Freund, T. F. (2000).
Distribution of chloride channel-2-immunoreactive neuronal and astrocytic processes in the hippocampus. *Neuroscience.* 101(1), 51-65

263. Simon, D. B., Bindra, R. S., Mansfield, T. A., Nelson-Williams, C., Mendonca, E., Stone, R., Schurman, S., Nayir, A., Alpay, H., Bakkaloglu, A., Rodriguez-Soriano, J., Morales, J. M., Sanjad, S. A., Taylor, C. M., Pilz, D., Brem, A., Trachtman, H., Griswold, W., Richard, G. A., John, E., Lifton, R. P. (1997).
Mutations in the chloride channel gene, *CLCNKB*, cause Bartter's syndrome type III. *Nat. Genet.* 17(2), 171-178
264. Skulachev, V. P. (1992).
The laws of cell energetics. *Eur. J. Biochem.* 208(2), 203-209
265. Skulachev, V. P. (1994).
The latest news from the sodium world. *Biochim. Biophys. Acta.* 1187, 216-221
266. Smith, T. G., Lecar, J., Redmann, S. J., Gage, P. W. (1985).
Voltage and patch clamping with microelectrodes. American Physiological Society, Bethesda, Maryland. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland
267. Smith, D., Xu, W., Varnold, R. (1991).
Oogenesis and oocyte isolation. In: Kay, B., Peng, H. (eds.). *Xenopus laevis: Practical uses in cell and molecular biology. Methods in Cell Biology.* 45-60
268. Smith, R. L., Clayton, G. H., Wilcox, C. L., Escudero, K. W., Staley, K. J. (1995).
Differential expression of an inwardly rectifying chloride conductance in rat brain neurons: a potential mechanism for cell-specific modulation of postsynaptic inhibition. *J. Neurosci.* 15(5.2), 4057-4067
269. Soreq, H. (1985).
The biosynthesis of biologically active proteins in mRNA-microinjected *Xenopus* oocytes. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 18(3), 199-238
270. Staley, K. (1994).
The role of an inwardly rectifying chloride conductance in postsynaptic inhibition. *J. Neurophysiol.* 72(1), 273-284
271. Staley, K., Smith, R., Schaack, J., Wilcox, C., Jentsch, T. J. (1996).
Alteration of GABA_A receptor function following gene transfer of the *CLC-2* chloride channel. *Neuron.* 17(3), 543-551
272. Standen, N. B., Green, P. T. A., Whitaker, M. J. (1987).
Microelectrode techniques: The Plymouth workshop handbook. The Company of Biologists, Cambridge

273. Staub, O., Dho, S., Henry, P., Correa, J., Ishikawa, T., McGlade, J., Rotin, D. (1996).
WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na⁺ channel deleted in Liddle's syndrome *EMBO J.* 15(10), 2371-2380
274. Staub, O., Gautschi, I., Ishikawa, T., Breitschopf, K., Ciechanover, A., Schild, L., Rotin, D. (1997).
Regulation of stability and function of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) by ubiquitination. *EMBO J.* 16(21), 6325-6336
275. Staub, O., Abriel, H., Plant, P., Ishikawa, T., Kanelis, V., Saleki, R., Horisberger, J. D., Schild, L., Rotin, D. (2000).
Regulation of the epithelial Na⁺ channel by Nedd4 and ubiquitination. *Kidney Int.* 57(3), 809-815
276. Stauber, A., Radanovic, T., Stange, G., Murer, H., Wagner, C. A., Biber, J. (2005).
Regulation of intestinal phosphate transport. II. Metabolic acidosis stimulates Na⁺-dependent phosphate absorption and expression of the Na⁺-P_i cotransporter NaPi-IIb in small intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288(3), G501-506
277. Steinmeyer, K., Ortland, C., Jentsch, T. J. (1991).
Primary structure and functional expression of a developmentally regulated skeletal muscle chloride channel. *Nature.* 354(6351), 301-304
278. Steinmeyer, K., Klocke, R., Ortland, C., Gronemeier, M., Jockusch, H., Gründer, S., Jentsch, T. J. (1991).
Inactivation of muscle chloride channel by transposon insertion in myotonic mice. *Nature.* 354(6351), 304-308
279. Steinmeyer, K., Lorenz, C., Pusch, M., Koch, M. C., Jentsch, T. J. (1994).
Multimeric structure of ClC-1 chloride channel revealed by mutations in dominant myotonia congenita (Thomsen). *EMBO J.* 13(4), 737-743
280. Steinmeyer, K., Schwappach, B., Bens, M., Vandewalle, A., Jentsch, T. J. (1995).
Cloning and functional expression of rat CLC-5, a chloride channel related to kidney disease. *J. Biol. Chem.* 270(52), 31172-31177
281. Stobrawa, S. M., Breiderhoff, T., Takamori, S., Engel, D., Schweizer, M., Zdebik, A. A., Bösl, M. R., Ruether, K., Jahn, H., Draguhn, A., Jahn, R., Jentsch, T. J. (2001).
Disruption of ClC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus. *Neuron.* 29(1), 185-196

282. Sumikawa, K., Houghton, M., Emtage, J. S., Richards, B. M., Barnard, E. A. (1981).
Active multi-subunit ACh receptor assembled by translation of heterologous mRNA in *Xenopus* oocytes. *Nature*. 292(5826), 862-864
283. Tanaka, Y., DeLuca, H. F. (1973).
The control of 25-hydroxyvitamin D metabolism by inorganic phosphorus. *Arch. Biochem. Biophys.* 154(2), 566-574
284. Tewari, K. P., Malinowska, D. H., Sherry, A. M., Cuppoletti, J. (2000).
PKA and arachidonic acid activation of human recombinant ClC-2 chloride channels, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279(1), C40-50
285. Thiemann, A., Gründer, S., Pusch, M., Jentsch, T. J. (1992).
A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. *Nature*. 356(6364), 57-60
286. Tulk, B. M., Schlesinger, P. H., Kapadia, S. A., Edwards, J. C. (2000).
CLIC-1 functions as a chloride channel when expressed and purified from bacteria. *J. Biol. Chem.* 275(35), 26986-26993
287. Turk, E., Klisak, I., Bacallao, R., Sparkes, R. S., Wright, E. M. (1993).
Assignment of the human Na⁺/glucose cotransporter gene SGLT1 to chromosome 22q13.1. *Genomics*. 17(3), 752-754
288. Turk, E., Martín, M. G., Wright, E. M. (1994).
Structure of the human Na⁺/glucose cotransporter gene SGLT1. *J. Biol. Chem.* 269(21), 15204-15209
289. Turk, E., Wright, E. M. (1997).
Membrane topology motifs in the SGLT cotransporter family. *J. Membr. Biol.* 159(1), 1-20
290. Turk, E., Kim, O., le Coutre, J., Whitelegge, J. P., Eskandari, S., Lam, J. T., Kreman, M., Zampighi, G., Faull, K. F., Wright, E. M. (2000).
Molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* vSGLT: a model for sodium-coupled sugar cotransporters. *J. Biol. Chem.* 275(33), 25711-25716
291. Uldry, M., Thorens, B. (2004).
The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflugers Arch.* 447(5), 480-489
292. van Zeijl, M., Johann, S. V., Closs, E., Cunningham, J., Eddy, R., Shows, T. B., O'Hara, B. (1994).
A human amphotropic retrovirus receptor is a second member of the gibbon ape leukemia virus receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91(3), 1168-1172

293. Vandewalle, A., Cluzeaud, F., Peng, K. C., Bens, M., Lüchow, A., Günther, W., Jentsch, T. J. (2001).
Tissue distribution and subcellular localization of the ClC-5 chloride channel in rat intestinal cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280(2), C373-381
294. Vayro, S., Kemp, R., Beechey, R. B., Shirazi-Beechey, S. (1991).
Preparation and characterization of basolateral plasma-membrane vesicles from sheep parotid glands. Mechanisms of phosphate and D-glucose transport. *Biochem. J.* 279.3, 843-848
295. Veldman, C. M., Schläpfer, I., Schmid, C. (1997).
1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates sodium-dependent phosphate transport in osteoblast-like cells. *Bone.* 21(1), 41-47
296. Verri, T., Markovich, D., Perego, C., Norbis, F., Stange, G., Sorribas, V., Biber, J., Murer, H. (1995).
Cloning of a rabbit renal Na-Pi cotransporter. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 268(4.2), F626-633
297. von der Crone, S., Deppe, C., Barthel, A., Sasson, S., Joost, H. G., Schürmann, A. (2000).
Glucose deprivation induces Akt-dependent synthesis and incorporation of GLUT1, but not of GLUT4, into the plasma membrane of 3T3-L1 adipocytes. *Eur. J. Cell Biol.* 79(12), 943-949
298. Vrtovsniak, F., Jourdain, M., Cherqui, G., Lefebvre, J., Friedlander, G. (1994).
Glucocorticoid inhibition of Na-P_i cotransport in renal epithelial cells is mediated by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 269(12), 8872-8877
299. Wärntges, S., Friedrich, B., Henke, G., Durantou, C., Lang, P. A., Waldegger, S., Meyermann, R., Kuhl, D., Speckmann, E. J., Obermüller, N., Witzgall, R., Mack, A. F., Wagner, H. J., Wagner, A., Bröer, S., Lang, F. (2002).
Cerebral localization and regulation of the cell volume-sensitive serum- and glucocorticoid-dependent kinase SGK1. *Pflügers Arch.* 443(6), 617-624
300. Waerntges, S., Klingel, K., Weigert, C., Fillon, S., Buck, M., Schleicher, E., Rodemann, H. P., Knabbe, C., Kandolf, R., Lang, F. (2002).
Excessive transcription of the human serum and glucocorticoid dependent kinase hSGK1 in lung fibrosis. *Cell. Physiol. Biochem.* 12(2-3), 135-142
301. Wagman, A. S., Nuss, J. M. (2001).
Current therapies and emerging targets for the treatment of diabetes. *Curr. Pharm. Des.* 7(6), 417-450

302. Wagner, C. A., Friedrich, B., Setiawan, I., Lang, F., Bröer, S. (2000). The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. *Cell. Physiol. Biochem.* 10(1-2), 1-12
303. Wagner, C. A., Ott, M., Klingel, K., Beck, S., Melzig, J., Friedrich, B., Wild, K. N., Bröer, S., Moschen, I., Albers, A., Waldegger, S., Tümmler, B., Egan, M. E., Geibel, J. P., Kandolf, R., Lang, F. (2001). Effects of the serine/threonine kinase SGK1 on the epithelial Na⁺ channel (ENaC) and CFTR: implications for cystic fibrosis. *Cell. Physiol. Biochem.* 11(4), 209-218
304. Waldegger, S., Barth, P., Raber, G., Lang, F. (1997). Cloning and characterization of a putative human serine/threonine protein kinase transcriptionally modified during anisotonic and isotonic alterations of cell volume. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94(9), 4440-4445
305. Waldegger, S., Barth, P., Forrest, J. N. Jr., Greger, R., Lang, F. (1998). Cloning of *sgk* serine-threonine protein kinase from shark rectal gland – a gene induced by hypertonicity and secretagogues. *Pflugers Arch.* 436(4), 575-580
306. Waldegger, S., Erdel, M., Nagl, U. O., Barth, P., Raber, G., Steuer, S., Utermann, G., Paulmichl, M., Lang, F. (1998). Genomic organization and chromosomal localization of the human SGK protein kinase gene. *Genomics.* 51(2), 299-302
307. Waldegger, S., Klingel, K., Barth, P., Sauter, M., Rfer, M. L., Kandolf, R., Lang, F. (1999). *h-sgk* serine-threonine protein kinase gene as transcriptional target of transforming growth factor β in human intestine. *Gastroenterology.* 116(5), 1081-1088
308. Waldegger, S., Gabrysch, S., Barth, P., Fillon, S., Lang, F. (2000). *h-sgk* serine-threonine protein kinase as transcriptional target of p38/MAP kinase pathway in HepG2 human hepatoma cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 10(4), 203-208
309. Wang, J., Barbry, P., Maiyar, A. C., Rozansky, D. J., Bhargava, A., Leong, M., Firestone, G. L., Pearce, D. (2001). SGK integrates insulin and mineralocorticoid regulation of epithelial sodium transport. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 280(2), F303-313
310. Weber, W. M., Schwarz, W., Passow, H. (1989). Endogenous D-glucose transport in oocytes of *Xenopus laevis*. *J. Membr. Biol.* 111(1), 93-102

311. Weber, W. M., Liebold, K. M., Clauss, W. (1995).
Amiloride-sensitive Na⁺ conductance in native *Xenopus* oocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1239(2), 201-206
312. Weber, W. M., Liebold, K. M., Reifarth, F. W., Uhr, U., Clauss, W. (1995).
Influence of extracellular Ca²⁺ on endogenous Cl⁻ channels in *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch.* 429(6), 820-824
313. Weber, W. M. (1999).
Endogenous ion channels in oocytes of *xenopus laevis*: recent developments. *J. Membr. Biol.* 170(1), 1-12
314. Webster, M. K., Goya, L., Firestone, G. L. (1993).
Immediate-early transcriptional regulation and rapid mRNA turnover of a putative serine/threonine protein kinase. *J. Biol. Chem.* 268(16), 11482-11485
315. Webster, M. K., Goya, L., Ge, Y., Maiyar, A. C., Firestone, G. L. (1993).
Characterization of sgk, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum. *Mol. Cell. Biol.* 13(4), 2031-2040
316. Weinreich, F., Jentsch, T. J. (2001).
Pores formed by single subunits in mixed dimers of different CLC chloride channels. *J. Biol. Chem.* 276(4), 2347-2353
317. Wells, R. G., Pajor, A. M., Kanai, Y., Turk, E., Wright, E. M., Hediger, M. A. (1992).
Cloning of a human kidney cDNA with similarity to the sodium-glucose cotransporter. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 263(3.2), F459-465
318. Wells, R. G., Mohandas, T. K., Hediger, M. A. (1993).
Localization of the Na⁺/glucose cotransporter gene SGLT2 to human chromosome 16 close to the centromere. *Genomics.* 17(3), 787-789
319. Werner, A., Kempson, S. A., Biber, J., Murer, H. (1994).
Increase of Na/P_i-cotransport encoding mRNA in response to low P_i diet in rat kidney cortex. *J. Biol. Chem.* 269(9), 6637-6639
320. Werner, A., Dehmelt, L., Nalbant, P. (1998).
Na⁺-dependent phosphate cotransporters: the NaPi protein families. *J. Exp. Biol.* 201.23, 3135-3142
321. Werner, A., Nalbant, P., Dehmelt, L. (1999).
The intestinal Na⁺-Pi co-transporter IIb: a novel keyplayer in phosphate homeostasis (Abstract). *J. Physiol. (Lond.)*. 520, 127

322. Werner, A., Kinne, R. K. (2001). Evolution of the Na-P_i cotransport systems. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280(2), R301-312
323. Willsky, G. R., Malamy, M. H. (1980). Characterization of two genetically separable inorganic phosphate transport systems in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 144(1), 356-365
324. Wollnik, B., Kubisch, C., Steinmeyer, K., Pusch, M. (1997). Identification of functionally important regions of the muscular chloride channel ClC-1 by analysis of recessive and dominant myotonic mutations. *Hum. Mol. Genet.* 6(5), 805-811
325. White, M. M., Miller, C. (1979). A voltage-gated anion channel from the electric organ of *Torpedo californica*. *J. Biol. Chem.* 254(20), 10161-10166
326. White, M. M., Miller, C. (1981). Probes of the conduction process of a voltage-gated Cl⁻ channel from *Torpedo* electroplax. *J. Gen. Physiol.* 78(1), 1-18
327. Wright, E. M. (2001). Renal Na⁺-glucose cotransporters. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 280(1), F10-18
328. Wright, E. M., Turk, E. (2004). The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch.* 447(5), 510-518
329. Wright, E. M., Hirayama, B. A., Loo, D. F. (2007). Active sugar transport in health and disease. *J. Intern. Med.* 261(1), 32-43
330. Wrong, O. M., Norden, A. G., Feest, T. G. (1994). Dent's disease; a familial proximal renal tubular syndrome with low-molecular-weight proteinuria, hypercalciuria, nephrocalcinosis, metabolic bone disease, progressive renal failure and a marked male predominance. *QJM.* 87(8), 473-493
331. Xiong, H., Li, C., Garami, E., Wang, Y., Ramjeesingh, M., Galley, K., Bear, C. E. (1999). ClC-2 activation modulates regulatory volume decrease. *J. Membr. Biol.* 167(3), 215-221
332. Xu, H., Collins, J. F., Bai, L., Kiela, P. R., Ghishan, F. K. (2001). Regulation of the human sodium-phosphate cotransporter NaP_i-IIb gene promoter by epidermal growth factor. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280(3), C628-636

333. Xu, H., Bai, L., Collins, J. F., Ghishan, F. K. (2002). Age-dependent regulation of rat intestinal type IIb sodium-phosphate cotransporter by 1,25-(OH)₂ vitamin D₃. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282(3), C487-493
334. Xu, H., Uno, J. K., Inouye, M., Xu, L., Drees, J. B., Collins, J. F., Ghishan, F. K. (2003). Regulation of intestinal NaPi-IIb cotransporter gene expression by estrogen. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 285(6), G1317-1324
335. Xu, J., Koni, P. A., Wang, P., Li, G., Kaczmarek, L., Wu, Y., Li, Y., Flavell, R. A., Desir, G. V. (2003). The voltage-gated potassium channel Kv1.3 regulates energy homeostasis and body weight. *Hum. Mol. Genet.* 12(5), 551-559
336. Yeh, J. K., Aloia, J. F. (1987). Effect of glucocorticoids on the passive transport of phosphate in different segments of the intestine in the rat. *Bone Miner.* 2(1), 11-19
337. You, G., Lee, W. S., Barros, E. J., Kanai, Y., Huo, T. L., Khawaja, S., Wells, R. G., Nigam, S. K., Hediger, M. A. (1995). Molecular characteristics of Na⁺-coupled glucose transporters in adult and embryonic rat kidney. *J. Biol. Chem.* 270(49), 29365-29371
338. Yun, C. C., Chen, Y., Lang, F. (2002). Glucocorticoid activation of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3 revisited. The roles of SGK1 and NHERF2. *J. Biol. Chem.* 277(10), 7676-7683
339. Yun, C. C., Palmada, M., Embark, H. M., Fedorenko, O., Feng, Y., Henke, G., Setiawan, I., Boehmer, C., Weinman, E. J., Sandrasagra, S., Korbmayer, C., Cohen, P., Pearce, D., Lang, F. (2002). The serum and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 and the Na⁺/H⁺ exchange regulating factor NHERF2 synergize to stimulate the renal outer medullary K⁺ channel ROMK1. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13(12), 2823-2830
340. Yusufi, A. N., Berndt, T. J., Murayama, N., Knox, F. G., Dousa, T. P. (1987). Calcitonin inhibits Na⁺ gradient-dependent phosphate uptake across renal brush-border membranes. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 252(4.2), F598-604
341. Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., Bartel, D. P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell.* 101(1), 25-33

342. Zampighi, G. A., Kreman, M., Boorer, K. J., Loo, D. D., Bezanilla, F., Chandy, G., Hall, J. E., Wright, E. M. (1995).
A method for determining the unitary functional capacity of cloned channels and transporters expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Membr. Biol.* 148(1), 65-78
343. Zeuthen, T., Belhage, B., Zeuthen, E. (2006).
Water transport by Na⁺-coupled cotransporters of glucose (SGLT1) and of iodide (NIS). The dependence of substrate size studied at high resolution. *J. Physiol.* 570.3, 485-499
344. Zhao, N., Tenenhouse, H. S. (2000).
Npt2 gene disruption confers resistance to the inhibitory action of parathyroid hormone on renal sodium-phosphate cotransport. *Endocrinology.* 141(6), 2159-2165
345. Zheng, Y. J., Furukawa, T., Ogura, T., Tajimi, K., Inagaki, N. (2002).
M phase-specific expression and phosphorylation-dependent ubiquitination of the ClC-2 channel. *J. Biol. Chem.* 277(35), 32268-32273

7 Publikationsverzeichnis

1. Dieter, M., Palmada, M., Rajamanickam, J., Aydin, A., Busjahn, A., Boehmer, C., Luft, F. C., Lang, F. (2004). Regulation of glucose transporter SGLT1 by ubiquitin ligase Nedd4-2 and kinases SGK1, SGK3, and PKB. *Obes. Res.* 12(5), 862-870
2. Palmada, M., Dieter, M., Boehmer, C., Waldegger, S., Lang, F. (2004). Serum and glucocorticoid inducible kinases functionally regulate ClC-2 channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321(4), 1001-1006
3. Palmada, M., Dieter, M., Speil, A., Böhmer, C., Mack, A. F., Wagner, H. J., Klingel, K., Kandolf, R., Murer, H., Biber, J., Closs, E. I., Lang, F. (2004). Regulation of intestinal phosphate cotransporter NaPi IIb by ubiquitin ligase Nedd4-2 and by serum- and glucocorticoid-dependent kinase 1. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287(1), G143-150

8 Danksagung und Lebenslauf

8.1 Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Florian Lang danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas der vorliegenden Promotion, seine fachlichen Anregungen und seine Begeisterungsfähigkeit, die entscheidend zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Christoph Böhmer für die Einarbeitung in die Elektrophysiologie, für die ständige und geduldige Unterstützung bei Planung und Durchführung der Experimente und die Betreuung der schriftlichen Ausarbeitung der Dissertation, nicht zuletzt auch für die Schaffung eines äußerst angenehmen Arbeitsumfeldes in seiner Arbeitsgruppe.

Frau Prof. Dr. Monica Palmada möchte ich insbesondere für die Durchführung der für die in Kapitel 7 aufgeführten Publikationen erforderlichen molekularbiologischen Experimente meinen Dank aussprechen.

Frau Birgitta Noll danke ich für ihre Hilfe und Unterstützung bei der Oozytenpräparation und cRNA-Synthese. Erwähnt sei an dieser Stelle ihre humorvolle Art, die viel zum ausgezeichneten Arbeitsklima beigetragen hat.

Peter Dürr, Jürgen Kahlke und Uwe Schüler möchte ich für die Unterstützung bei der Lösung technischer Probleme danken.

Dank gebührt schließlich allen weiteren Mitarbeitern des Physiologischen Instituts sowie meinen „Mitdoktoranden“, die mir bei Problemen und Fragen aller Art zur Seite standen.

8.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Michael Dieter
Geburtsdatum: 28.05.1978
Geburtsort: Tübingen

Schulische Ausbildung

1984 – 1988 Grundschule Hoffmannschule Reutlingen
1988 – 1997 Albert-Einstein-Gymnasium Reutlingen
06/1997 Abitur, Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

08/1997 – 09/1998 Johanniter-Unfallhilfe Reutlingen

Akademische Ausbildung

10/1998 – 11/2005 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-
Universität Tübingen
28.08.2000 Ärztliche Vorprüfung
28.08.2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09.09.2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2004 – 09/2005 Praktisches Jahr im Klinikum am Steinenberg, Reutlingen
Wahlfach: Pädiatrie
10/2005 Carl-Liebermeister-Preis der Universität Tübingen für
herausragende wissenschaftliche Leistungen im Rahmen
der Promotion
11.11.2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit 03/2006 Tätigkeit als Assistenzarzt in der Abteilung für
Innere Medizin, Klinikum Stuttgart