

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

**Die Regulation des Kaliumkanals  $K_v1.5$  durch die  
Serum- und Glukokortikoid-induzierbare Kinase**

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

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

**vorgelegt von  
Jörg Benjamin Laufer  
aus Villingen-Schwenningen  
2011**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lang

2. Berichterstatter: Professor Dr. E. Gulbins

*für meine Eltern*

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Ionenkanäle.....	1
1.2	Die Familie der Kaliumkanäle.....	2
1.2.1	Allgemeines .....	2
1.2.2	K <sub>v</sub> 1.5.....	8
1.3	Die Serum- und Glukokortikoid-induzierbare Kinase.....	9
1.3.1	Regulation der SGK1 .....	10
1.3.2	Physiologische Funktion .....	12
1.4	Das Gerüstprotein NHERF .....	12
1.5	Die Ubiquitinligase Nedd4.....	14
1.6	Fragestellung der Arbeit .....	16
2	Material und Methoden.....	18
2.1	Verwendete Lösungen und Substanzen.....	18
2.2	Expression in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten .....	20
2.2.1	Allgemeines .....	20
2.2.2	Oozytenpräparation .....	21
2.2.3	cRNA-Synthese .....	24
2.2.4	cRNA-Injektion.....	25
2.3	Elektrophysiologische Messungen .....	27
2.3.1	Versuchsaufbau.....	27
2.3.2	Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp .....	28
2.3.3	Ausführung der Experimente .....	30
2.3.4	Auswertung und Statistik .....	33
2.4	Western-Blot .....	34
2.5	Zielgerichtete Mutagenese .....	35

2.6	Coimmunopräzipitation.....	36
2.7	Nachweis der K <sub>V</sub> 1.5 Ubiquitinierung.....	37
2.8	Nachweis der K <sub>V</sub> 1.5 Phosphorylierung.....	37
3	Versuche und Ergebnisse .....	38
3.1	Molekulare Mechanismen der Stimulation durch NHERF1/2 .....	38
3.1.1	Stimulation durch NHERF1/2.....	38
3.1.2	K <sub>V</sub> 1.5 interagiert direkt mit NHERF2 .....	41
3.1.3	Das C-terminale PDZ-Bindemotiv ist essentiell für die Stimulation durch NHERF2 .....	42
3.1.4	NHERF2 erhöht die K <sub>V</sub> 1.5 Membranexpression .....	47
3.1.5	NHERF2 stabilisiert den K <sub>V</sub> 1.5 in der Plasmamembran.....	48
3.1.6	Synergistischer Effekt von SGK1 und NHERF2 .....	49
3.1.7	NHERF2 interagiert mit K <sub>V</sub> 1.5 über seine zweite PDZ-Domäne ...	53
3.1.8	Effekte des NHERF sind spezifisch für K <sub>V</sub> 1.5 .....	59
3.2	Molekulare Mechanismen der Stimulation durch SGK1 .....	61
3.2.1	SGK1 Phosphorylierungsstellen .....	61
3.2.2	Dexamethason und Insulin verstärken die Aktivierung der SGK1.	63
3.2.3	Die SGK1 wirkt nicht über Phosphorylierung auf den K <sub>V</sub> 1.5 .....	65
3.2.4	Nedd4-2 führt zur Ubiquitinierung des K <sub>V</sub> 1.5 .....	67
3.2.5	SGK1 hemmt den Effekt der Nedd4-2 .....	71
3.2.6	SGK1 verändert die Kanalkinetiken nicht .....	73
3.2.7	SGK1 stabilisiert den K <sub>V</sub> 1.5 in der Plasmamembran .....	75
4	Diskussion.....	78
4.1	Fehlerdiskussion .....	78
4.1.1	Expression in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	78
4.1.2	Oozyten und cRNA.....	78

## Inhaltsverzeichnis

---

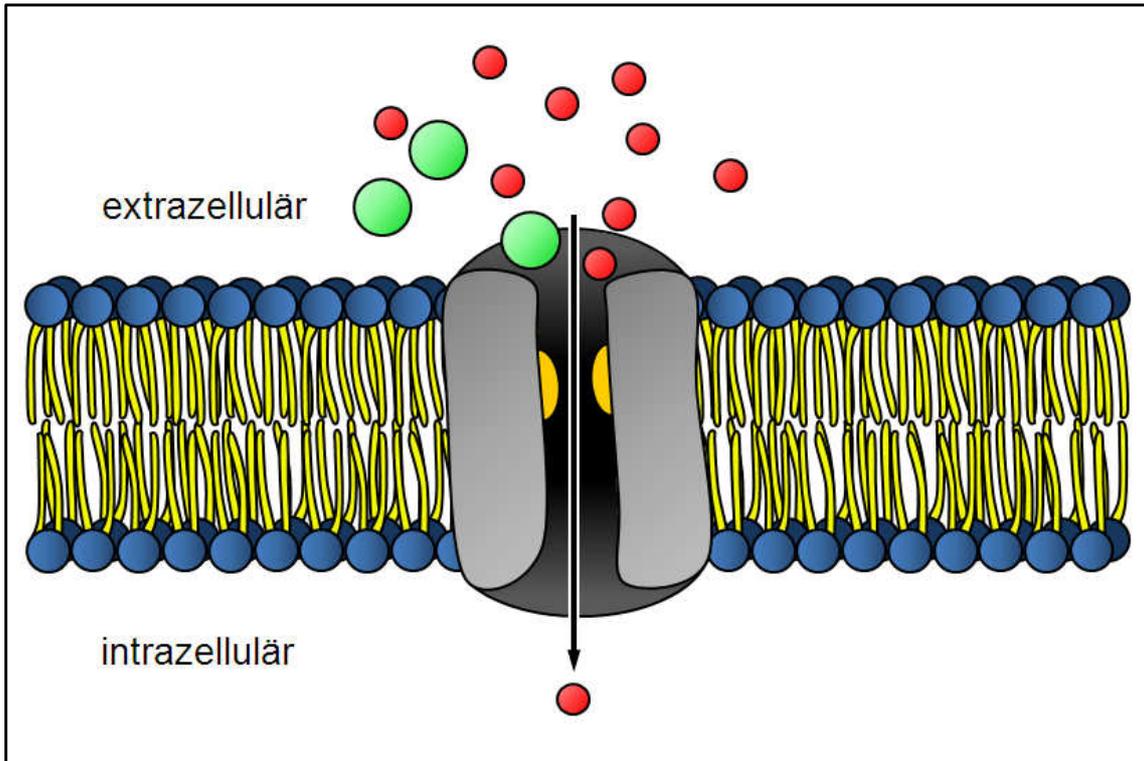
4.1.3	Verwendete Lösungen.....	79
4.1.4	Elektrophysiologischer Messplatz.....	79
4.2	Molekulare Mechanismen der Stimulation durch NHERF1/2 .....	80
4.3	Molekulare Mechanismen der Stimulation durch SGK1 .....	86
5	Zusammenfassung.....	91
6	Literatur .....	93
6.1	Abkürzungen .....	93
6.2	Publikationsverzeichnis .....	94
6.3	Literaturverzeichnis .....	95
7	Anhang.....	110
7.1	Danksagung .....	110
7.2	Lebenslauf.....	112

# 1 Einleitung

## 1.1 Ionenkanäle

Ionenkanäle sind Proteine, die beim Aufbau und bei der Kontrolle des Membranpotentials eine entscheidende Rolle spielen. Zudem besitzen sie fundamentale Aufgaben bei der Fortleitung elektrischer Signale im Nervensystem und bei der Muskelerregung. Sie erlauben den spezifischen Fluss von Ionen über die Membran entsprechend dem elektrochemischen Gradienten, der sich sowohl aus der Konzentration der entsprechenden Ionen als auch aus dem elektrischen Potential über die Membran ergibt. Dazu wird anders als bei aktiven Membrantransportern keine Energie verbraucht (104).

Ionenkanäle sind integrale Membranproteine, die nach Ausbildung der Quartärstruktur eine mit Wasser gefüllte Pore bilden, die relativ spezifisch nur bestimmte Ionen, wie z.B.  $\text{Na}^+$  oder  $\text{K}^+$ -Ionen, hindurchtreten lassen. Die Poren bildenden Proteine sind häufig homologe Proteine. Verschiedene heterologe Untereinheiten werden als  $\alpha$ -,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Untereinheiten bezeichnet. So wird die Pore bei spannungsabhängigen Kaliumkanälen durch vier homologe  $\alpha$ -Untereinheiten gebildet. Bei dem epithelialen Natriumkanal geschieht dies allerdings durch zwei  $\alpha$ -, eine  $\beta$ - und eine  $\gamma$ -Untereinheit. Es existieren Ionenkanäle, die dauerhaft geöffnet sind, d.h. den Durchtritt von Ionen durch die Membran immer ermöglichen. Andere wiederum werden durch eine Änderung des Membranpotentials geöffnet (z.B. spannungsabhängige Kaliumkanäle), wieder Andere sind Liganden aktivierte Ionenkanäle (z.B. der nikotinische Acetylcholinrezeptor) (104).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Ionenkanals.** Gezeigt ist ein Ionenkanal, der als integrales Membranprotein den Durchtritt von spezifischen Ionen durch die Plasmamembran anhand ihres elektrochemischen Gradienten ermöglicht. Dabei spielt der hier auch dargestellte Selektivitätsfilter eine wichtige Rolle bei der Spezifität der durchtretenden Ionen; den hier größer dargestellten Ionen ist der Durchtritt verwehrt.

## 1.2 Die Familie der Kaliumkanäle

### 1.2.1 Allgemeines

Kalium-selektive Ionenkanäle stellen die größte und zugleich auch vielfältigste Gruppe von Ionenkanälen dar. Die Beteiligung von Kaliumkanälen an den meisten wichtigen biologischen Funktionen ist unumstritten. So spielen sie beispielsweise eine Rolle bei der Bildung des Membranpotentials, bei der Muskelkontraktion und bei der Insulinsekretion (96, 97, 114). Jede Zelle von eukaryotischen Organismen nutzt eine spezifische Kombination aus Kaliumkanälen um ihr elektrisches Verhalten zu bestimmen. Bisweilen sind 70 Genloci auf dem Säugetiergenom beschrieben, die sich in vier Familien anhand der Anzahl ihrer Transmembrandomänen (TM), ihrer Porendomänen (P) und ihrem Aktivierungsmechanismus einteilen lassen: Die spannungsabhängigen

Kaliumkanäle ( $K_V$ ) (6TM 1P), die Kalzium-aktivierten Kaliumkanäle ( $K_{Ca}$ ) (6/7TM 1P), die Einwärtsgleichrichter ( $K_{IR}$ ) (2TM 1P) und die aus zwei Porendomänen bestehenden Kaliumkanäle ( $K_{2P}$ ) (4TM 2P) (65, 66).

### **$K_{Ca}$ -Kanäle**

Unter den  $K_{Ca}$ -Kanälen gibt es Kanäle, die ausschließlich durch niedrige intrazelluläre Kalziumkonzentrationen aktiviert werden, dazu gehört der  $K_{Ca}1.2$  und der  $K_{Ca}3.1$  (76, 80). Im Gegensatz dazu ist die Aktivität des  $K_{Ca}1.1$  sowohl durch niedriges Kalzium als auch durch das Membranpotential reguliert. Die  $K_{Ca}$ -Kanäle spielen eine wichtige Rolle im Kalzium abhängigen Signaltransduktionsprozess von elektrisch erregbaren und auch von nicht erregbaren Zellen. Die Kanäle können die Kalziumkonzentration nicht direkt messen, sondern benötigen dazu Calmodulin, welches ständig an die C-terminale Region der  $K_{Ca}$ -Kanäle gebunden ist (53, 153). Wenn Kalzium nun an Calmodulin bindet, führt dies zu einer Konformationsänderung, welche für das Gating des Kanals verantwortlich ist (126).

### **$K_{IR}$ -Kanäle**

Seit 1993, als die ersten Einwärtsgleichrichter  $K_{IR}1.1$  (ROMK1) und  $K_{IR}2.1$  (IRK1) geklont wurden, sind eine Vielzahl an neuen Mitgliedern dieser Familie identifiziert worden. Dazu gehört der G-Protein gekoppelte  $K_{IR}3$  und der ATP-sensitive  $K_{IR}6$ . Diese Kanäle spielen eine wichtige physiologische Rolle in der Funktion von vielen Organen, so im Herzen, in der Niere und in der Retina (66). Einwärtsgleichrichter erhielten ihren Namen, da sie positive Ladung, sprich positive Ionen verstärkt in die Zelle als aus der Zelle hinaus gelangen lassen. Bei stärker negativem Membranpotential als dem Ruhemembranpotential führt der positive Einwärtsstrom zu einer Rückführung zum Ruhemembranpotential. Verändert sich das Potential zusehends in positive Richtung wird die Kanalpore spannungsabhängig durch Polyamine und Magnesiumionen verschlossen (89). Man nimmt an, dass der durch die Einwärtsgleichrichter verursachte Strom eine wichtige Rolle in der Regulation der Aktivität von neuronalen Zellen besitzt.

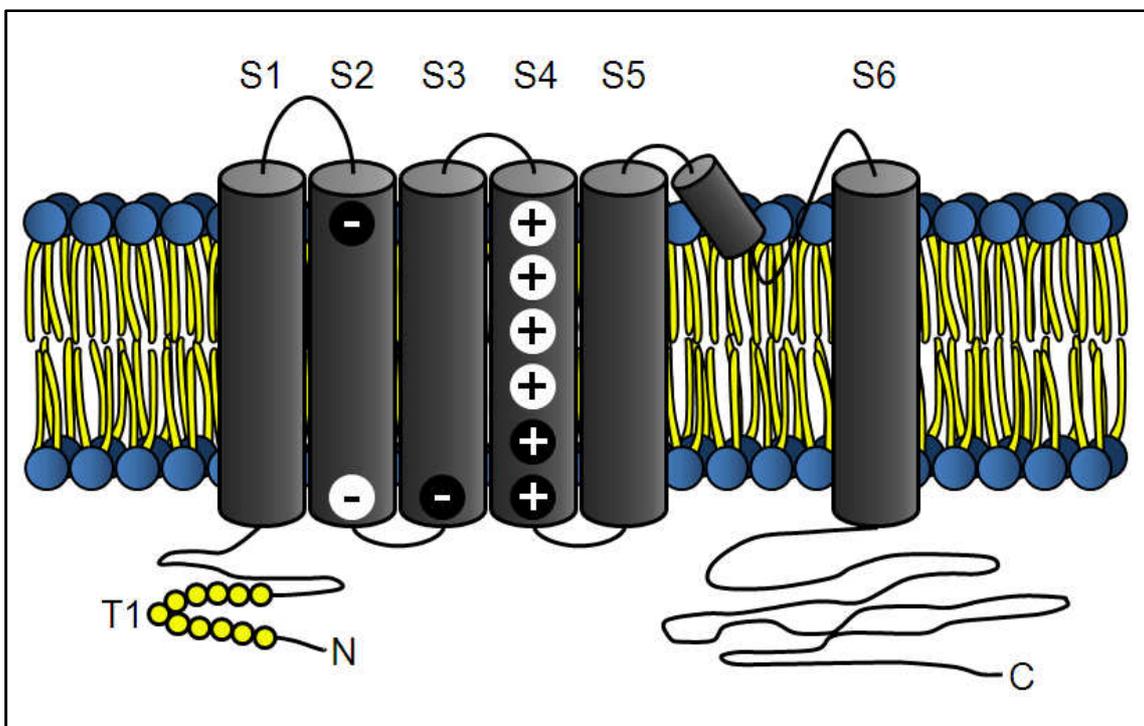
### **K<sub>2P</sub>-Kanäle**

Obwohl seit der Entdeckung der K<sub>2P</sub>-Kanäle gerade einmal 10 Jahre vergangen sind, konnte gezeigt werden, dass der früher als Leckstrom gedachte Strom von Kaliumionen über die Membran eigentlich keinen unkontrollierten Leckstrom darstellt, sondern ein Prozess ist, der durch eng regulierte Mechanismen die zelluläre Erregbarkeit steuert. Diese Kaliumströme stabilisieren das Membranpotential unterhalb der Aktionspotentialschwelle und führen zudem zu einer schnelleren Repolarisation. Obschon die Existenz solcher Leckströme bereits 1952 durch Hodgkin und Huxley vermutet wurde (72), blieb es vier Jahrzehnte nur bei Spekulationen. Das erste molekulare Korrelat für die Leckströme war die Entdeckung eines K<sub>2P</sub>-Kanals in *Saccharomyces cerevisiae* und *Caenorhabditis elegans* (85). Danach wurden weitere K<sub>2P</sub>-Kanäle aus neuromuskulärem Gewebe von *Drosophila melanogaster* isoliert und charakterisiert (62). Diese Kanäle konnten den Leckstrom erklären. Unter physiologischen Konditionen, sprich hohem intrazellulärem Kalium und niedrigem extrazellulärem Kalium, ist der Kaliumausstrom größer als der Einwärtsstrom (61). Ihren Namen verdanken die Kanäle der Tatsache, dass ihre  $\alpha$ -Untereinheiten über vier Transmembrandomänen verfügen, die anders als andere Kanäle über zwei Poren-Domänen verfügen.

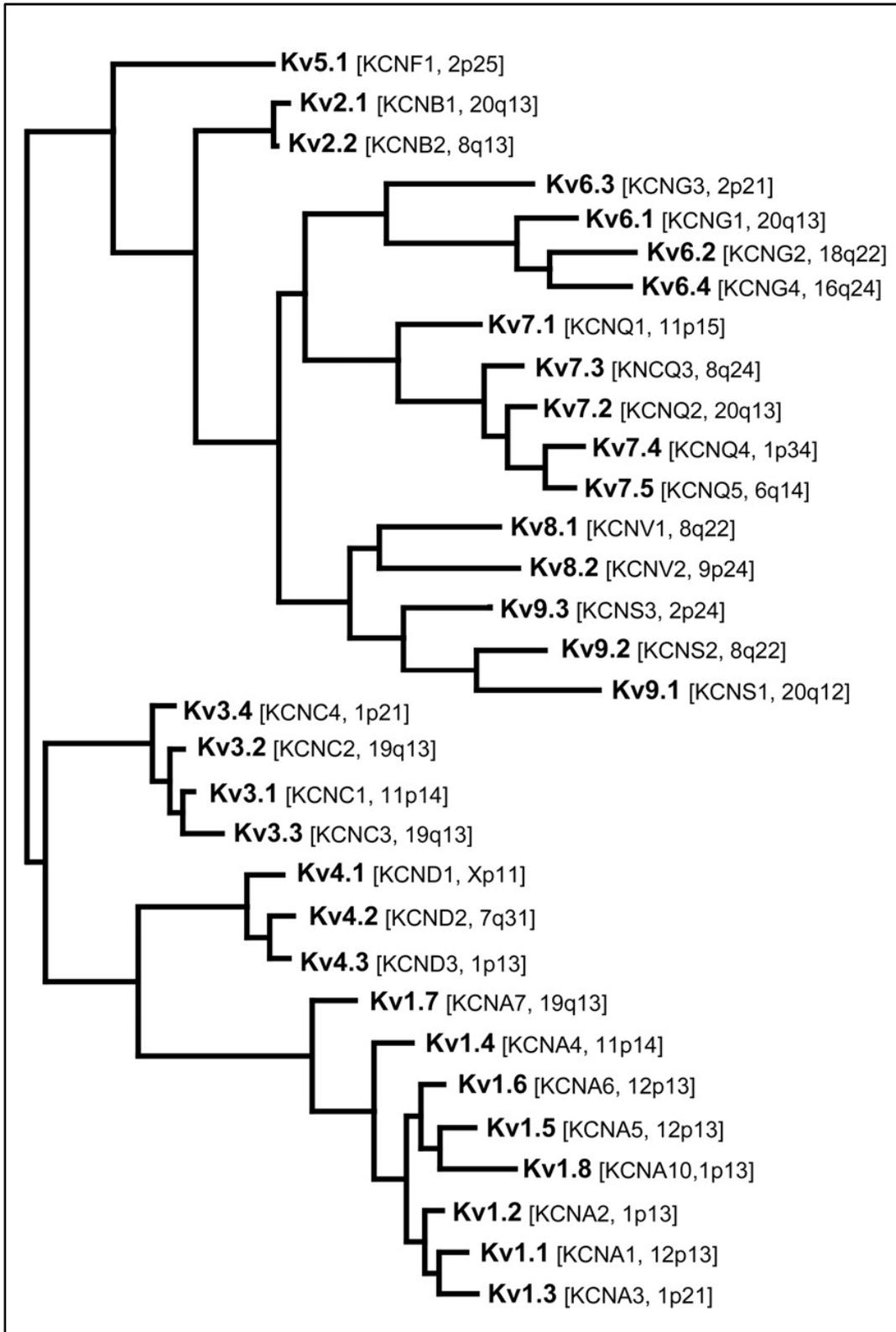
### **K<sub>V</sub>-Kanäle**

Die spannungsabhängigen Kaliumkanäle (K<sub>V</sub>) werden durch eine Änderung des Membranpotentials aktiviert. Die Familie kann auf Grundlage von Ähnlichkeiten in Sequenz und Funktion in verschiedene Unterfamilien eingeteilt werden. Vier dieser Unterfamilien, K<sub>V</sub>1 (Shaker), K<sub>V</sub>2 (Shab), K<sub>V</sub>3 (Shaw) und K<sub>V</sub>4 (Shal) bestehen aus  $\alpha$ -Untereinheiten (porenbildend), die mit  $\beta$ -Untereinheiten interagieren können. Jede  $\alpha$ -Untereinheit besteht aus sechs hydrophoben Transmembrandomänen mit einer Poren-Domäne (P) zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne. Die vierte Transmembrandomäne ist teilweise positiv geladen und agiert mit den Transmembrandomänen eins bis

drei als Spannungssensor, der die Konformationsänderung bewirkt, die zum Öffnen der Kanalpore beiträgt (122). Das erste identifizierte Gen eines Kalium-Kanals war der spannungsabhängige *shaker* Kanal der *Drosophila*. Auf ihn folgte die Identifikation anderer spannungsabhängiger Kalium-Kanäle in der Fruchtfliege, Säugetieren und vielen anderen Organismen. Die Gruppe der spannungsabhängigen  $K_V$ -Kanäle stellt mit 40 Genen die größte Gruppe unter den humanen Kaliumkanälen dar (66).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung einer  $\alpha$ -Untereinheit eines spannungsabhängigen Kaliumkanals ( $K_V$ ).** Die Zylinder repräsentieren die transmembranären Segmente S1-S6. Zwischen dem S5 und S6 Segment befindet sich die Porendomäne. Die Segmente S1-S4 werden zum Spannungssensor des Kanals gezählt. Die Zeichen + oder - auf weißem Hintergrund sind wichtig für die Spannungsmessung. Im Bereich des N-Terminus befindet sich die T1-Domäne (Tetramerisation 1). Modifiziert nach (10, 11).



**Abbildung 3: Phylogenetischer Baum der Kv1-9 Familien.** Neben den Namen der IUPHAR sind auch die Namen der HGNC und die chromosomale Lokalisation angegeben (66).

K<sub>V</sub>-Kanäle bilden eine sehr heterogene Gruppe von Kanälen. Sie ist um einiges heterogener als man anhand ihrer 40 Gene erwarten würde. Diese Variabilität erklärt sich aus folgenden Aspekten:

- (1) Heteromultimerisation: Jedes K<sub>V</sub>-Gen kodiert für eine Proteinuntereinheit, wobei vier Untereinheiten benötigt werden, um einen funktionellen K<sub>V</sub>-Kanal zu bilden. K<sub>V</sub>-Kanäle sind oft Homotetramere, können sich aber auch wie im Fall der K<sub>V</sub>1, K<sub>V</sub>7, K<sub>V</sub>10 Familien aus verschiedenen Untereinheiten aus der gleichen Familie zusammensetzen. Man kann davon ausgehen, dass sich diese Heterotetramere von ihren Homotetrameren in ihrer Funktion unterscheiden.
- (2)  $\beta$ -Untereinheiten: Die Familien K<sub>V</sub>5, K<sub>V</sub>6, K<sub>V</sub>8, K<sub>V</sub>9 kodieren für Untereinheiten, die selbst keinen funktionellen Kanal formen können. Diese  $\beta$ -Untereinheiten sind allerdings in der Lage mit den Untereinheiten der K<sub>V</sub>2 Familie ein Heteromer zu bilden. Dies erweitert nochmals die funktionelle Vielfalt.
- (3) Akzessorische Proteine: Eine Vielfalt anderer Proteine können in Verbindung mit den K<sub>V</sub>-Tetrameren treten und dadurch ihre Eigenschaften verändern. Als Beispiel wären hier die  $\beta$ -Untereinheiten (assoziiieren mit K<sub>V</sub>2-Kanälen), KCHIP (K<sub>V</sub> 4), Calmodulin (K<sub>V</sub>10) und minK (K<sub>V</sub>1) zu nennen.
- (4) Alternatives Splicen: Bei vielen Genen, die für K<sub>V</sub> -Kanäle kodieren, ist bekannt, dass sie über keine Introns verfügen, so fast die gesamte K<sub>V</sub> Familie (Ausnahme bildet K<sub>V</sub> 1.7) und K<sub>V</sub>9.3. Jedoch zeigt sich bei den Mitgliedern der Familien K<sub>V</sub> 3, 4, 6, 7, 9, 10 und 11, dass sie aus verschiedenen Exons aufgebaut sind, die alternativ gesplitt werden.
- (5) Posttranslationale Modifikation: Viele K<sub>V</sub>-Kanäle können posttranslational modifiziert werden durch Phosphorylierung (78), Ubiquitinierung (68) und Palmitolierung (64).

### 1.2.2 K<sub>V</sub>1.5

Der humane Kaliumkanal K<sub>V</sub>1.5 gehört zur Familie der spannungsabhängigen Kaliumkanäle und zur Unterfamilie der *shaker-related* Kaliumkanäle. Er wird in vielen Geweben gefunden, unter anderem im Herz (56, 60), im Gehirn (56), in Makrophagen (141), in glatten Muskelzellen (2, 7, 101, 107) und in pankreatischen Betazellen (140).

Wie bereits oben erwähnt, verfügt der K<sub>V</sub>1.5 über sechs Transmembrandomänen. Vier gleiche  $\alpha$ -Untereinheiten bilden einen funktionierenden Kanal aus. Innerhalb des Gens lassen sich vier mögliche Konsensussequenzen für die Serum- und Glukokortikoid-induzierbare Kinase 1 (SGK1) finden, und zwar an Position <sup>56</sup>Thr, <sup>81</sup>Ser, <sup>535</sup>Ser und <sup>569</sup>Ser (15). An diesen Positionen könnte die SGK1 mit dem Kanal direkt durch Phosphorylierung in Interaktion treten. Zudem besitzt der K<sub>V</sub>1.5 zwei so genannte PDZ-Bindemotive. Eines der beiden PDZ-Bindemotive befindet sich am C-Terminus, das andere am N-Terminus. Es konnte gezeigt werden, dass PDZ-Domäne tragende Proteine wie PSD95 sowohl an das N-terminale, als auch an das C-terminale PDZ-Bindemotiv binden können (50). Das N-terminale PDZ-Bindemotiv liegt in oder zumindest nahe an der T1 Region. Diese Region ist für den korrekten Zusammenbau der einzelnen  $\alpha$ -Untereinheiten unerlässlich um einen funktionierenden Kanal zu bilden (128). Durch das Binden von Proteinen an die T1 Domäne könnte der Zusammenbau des Kanals, die Interaktion des Kanals mit anderen Untereinheiten oder sogar das Gating beeinflusst werden (39).

Eine wichtige Rolle spielt der K<sub>V</sub>1.5 unter anderem im Herzen, wo er das molekularbiologische Korrelat für den „ultra-rapid delayed rectifier“-Strom darstellt, der für die Repolarisation entscheidend ist (48). Mutationen im Gen des K<sub>V</sub>1.5 können ein Long-QT-Syndrom verursachen, das mit ventrikulären Arrhythmien, Torsade de pointes (130), Synkopen und dem plötzlichen Herztod einhergehen kann. Transgene Mäuse ohne funktionellen K<sub>V</sub>1.5 zeigen ein Long-QT-Syndrom. Nach einer in vivo Infektion mit einem Adenovirus, der funktionellen K<sub>V</sub>1.5 in die Kardiomyozyten integriert, normalisiert sich die

Aktionspotentialdauer und verkürzt sich das QT-Intervall (20). Zudem bedeutend ist der  $K_v1.5$  bei dem Prozess der Insulinsekretion, wobei eine erhöhte  $K_v1.5$ -Aktivität mit einer verminderten Insulinsekretion einhergeht. So zeigen transgene Mäuse mit einer Überexpression von  $K_v1.5$  niedrigere Seruminsulinspiegel als Mäuse vom Wildtyp (96, 97, 114, 136).

### **1.3 Die Serum- und Glukokortikoid-induzierbare Kinase**

Die Serum- und Glukokortikoid-induzierbare Kinase (SGK1) wurde ursprünglich in Brustkrebszellen von Ratten entdeckt und kloniert. Es zeigte sich, dass sie transkriptionell durch Glukokortikoide und die Zugabe von Serum reguliert wird (58, 148, 149). Das im menschlichen Organismus zu findende Homolog wurde entdeckt als ein Zellvolumen reguliertes Gen, das bei Abnahme des Zellvolumens vermehrte Aktivität zeigt (145). Mittlerweile weiß man, dass die SGK1 unter der Kontrolle von den verschiedensten Einflüssen steht. Es existieren zwei nahe verwandte Isoformen, SGK2 und SGK3. Die katalytische Domäne dieser zweier Isoformen zeigt eine 80 %ige Homologie in ihrer Primärsequenz im Vergleich zur SGK1 (88).

Die Kinasen werden in vielen verschiedenen Spezies exprimiert, wie z.B. im Hai (144) und dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (69). Hefen exprimieren zwei zur SGK1 orthologe Kinasen, YPK1 und YKR2, die an der Endozytose beteiligt sind (43) und für das Überleben benötigt werden (27). Hefen, die ohne YPK1 und YKR1 eigentlich sterben würden, können durch die Expression der SGK1 gerettet werden (27).

Wenn man den Säugetierorganismus betrachtet, wird die SGK1 von nahezu allen Geweben exprimiert (145). Die Transkriptionslevel zwischen den verschiedenen Zelltypen eines Gewebes variieren jedoch stark, so zu sehen im Gehirn (63, 106, 135), im Auge (118), in der Lunge (142), der Niere (28, 59), der Leber (57), dem Darm (146), dem Pankreas (86) und im Ovar (5). Außerdem werden während der Embryonalphase typische Expressionsmuster gefunden (33, 73). Die Lokalisation der SGK1 hängt wohl von dem funktionellen

Zustand der Zelle ab. So zeigte sich, dass in Zellen, die Serum ausgesetzt wurden, die SGK1 durch  $\alpha$ -Importin in den Nucleus geführt wird (98). Nach Zugabe von Glukokortikoiden oder Inkubation in hyperosmolarer Lösung kommt es zu einer verstärkten Konzentration der Kinase im Cytosol (58).

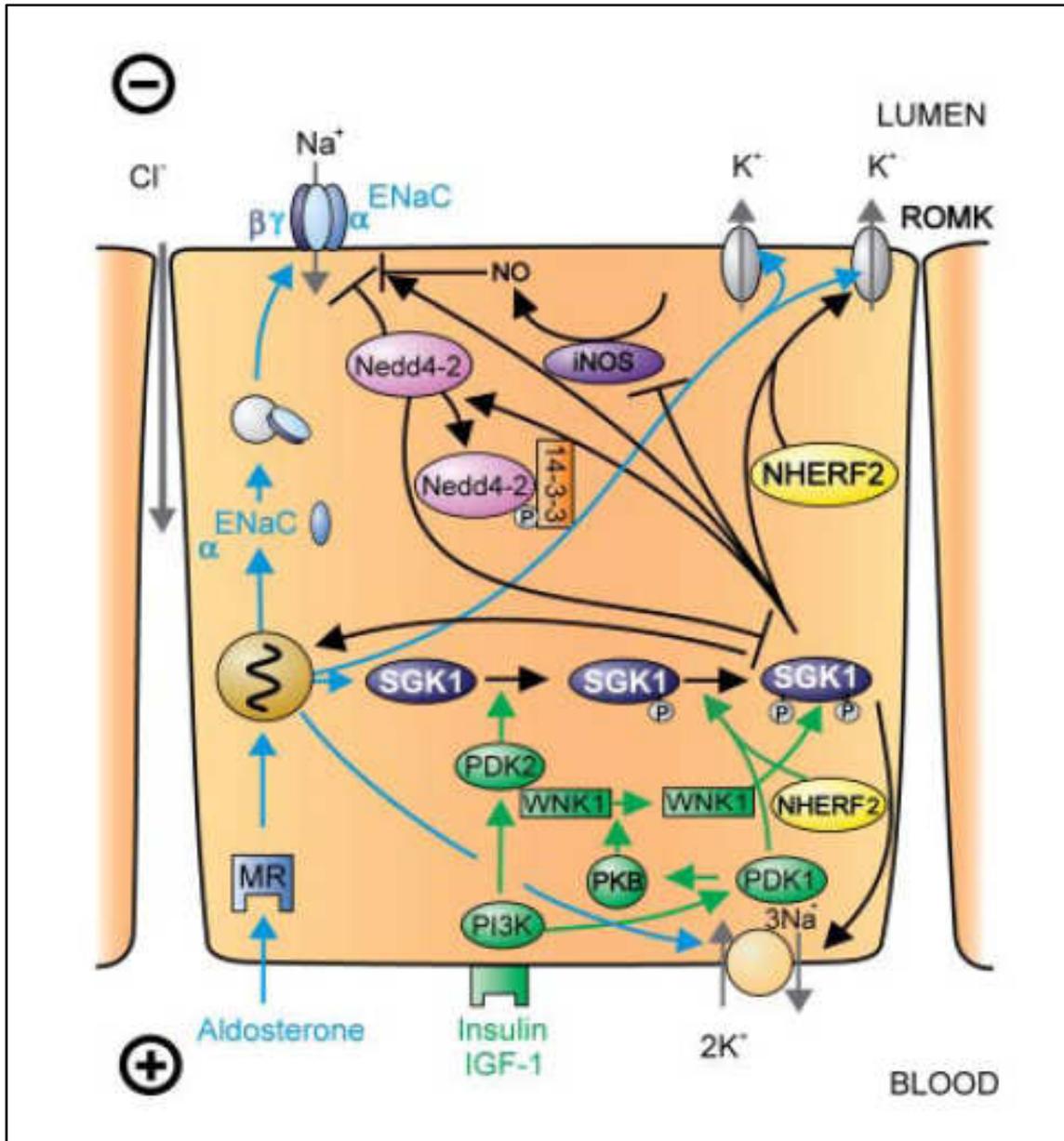
### 1.3.1 Regulation der SGK1

Die Regulation der SGK1 geschieht im Prinzip über zwei verschiedene Mechanismen. Zum einen über die Höhe der Expression und zum anderen über eine Veränderung der Aktivität der translatierten Kinase. Wie bereits erwähnt, wird die Expression durch Glukokortikoide sowie durch Serum gesteigert (18, 35). Viele andere Mediatoren nehmen jedoch ebenso Einfluss auf die Expression, dazu zählen unter anderem Mineralokortikoide (12), Gonadotropine (29), Vitamin D<sub>3</sub> (4), Interleukin-6 (102) und weitere Cytokine (36, 94).

Die Kinase wird mittels Phosphorylierung in ihre aktive Form überführt. Dies geschieht mit Hilfe einer Signalkaskade durch die PI3-Kinase, die PIP3-abhängige Kinase PDK1 und durch eine bis jetzt noch unbekannte PIP3-abhängigen Kinase PDK2 oder auch H-Motiv genannt (93). Dabei phosphoryliert die PDK1 die SGK1 im sogenannten activation loop (T-loop) an Stelle <sup>256</sup>Thr und die PDK2/H-Motiv im hydrophoben Motiv im Bereich des C-Terminus an Stelle <sup>422</sup>Ser (87, 112). Die Phosphorylierung durch die PDK1 ist erleichtert, wenn die SGK1 bereits an Stelle <sup>422</sup>Ser phosphoryliert wurde. Ein alternativer Weg zur Aktivierung der SGK1 geht über das Gerüstprotein NHERF2 (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor), auf welches später noch genauer eingegangen wird. NHERF2 kann die SGK1 und die PDK1 in räumliche Nähe bringen und damit die Phosphorylierung der SGK1 fördern. NHERF2 interagiert mit dem PDZ-Bindemotiv der SGK1 und der PIF-Bindetasche der PDK1. Die Bildung dieses ternären Komplexes erleichtert die Phosphorylierung der SGK1 im T-loop an Stelle <sup>256</sup>Thr durch die PDK1 (30).

Es lässt sich also schlussfolgern, dass der Austausch von Serin an Stelle 422 gegen Aspartat zu einer konstitutiv aktiven <sup>S422D</sup>SGK1 führt (88). Wenn man hingegen Lysin an Position 127 durch Asparagin ersetzt, führt dies zu einer inaktiven Mutante der SGK1 (<sup>K127N</sup>SGK1), da sich an dieser Position die ATP-

Bindestelle befindet, die für die enzymatische Aktivität benötigt wird (88). Mittels der PI3-Kinase Signalkaskade wird die SGK1 zudem durch Insulin und IGF-1 (113) aktiviert.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Regulation und Interaktion der Serum- und Glukokortikoid-induzierbaren Kinase (SGK1).** Aldosteron führt durch eine Bindung an den Mineralokortikoidrezeptor zu einer erhöhten Expression der SGK1. Die translatierte SGK1 bedarf der Phosphorylierung an Stelle <sup>422</sup>Ser durch eine Signaltransduktionkaskade der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) und einer bislang unbekannt Kinase (PDK2). Diese Phosphorylierung führt zur Phosphorylierung an Stelle <sup>256</sup>Thr durch die PDK1 und überführt damit die SGK1 in ihre aktive Form. Gezeigt sind weiterhin bereits bekannte Interaktionen der SGK1 mit anderen Proteinen (93). Abbildung aus (93).

### 1.3.2 Physiologische Funktion

Die SGK1 kann Proteine phosphorylieren, die über eine SGK1-Konsensussequenz verfügen. Diese Sequenz wurde definiert als R-X-R-X-X-S/T- $\Phi$ , wobei X für eine beliebige Aminosäure und  $\Phi$  für eine hydrophobe Aminosäure steht (93). Dies bedeutet jedoch nicht, dass jedes Protein, das über eine solche Sequenz verfügt auch mit der SGK1 interagiert. Sie steuert eine Vielzahl von zellulären Funktionen durch die direkte Phosphorylierung der Effektor- oder Regulatorproteine. Jedoch kann sie ihre Wirkung auch über andere Proteine auf ihre Zielproteine entfalten. Zu solchen Proteinen gehören die Ubiquitinligase Nedd4-2 und das Gerüstprotein NHERF2, auf welche im Laufe dieser Arbeit noch eingegangen wird.

Es konnte gezeigt werden, dass die SGK1 Ionenkanäle und Membrantransporter reguliert. Als Beispiel wäre dabei der ENaC (28), der ROMK (110), der  $K_v1.5$  (140) und der SGLT1 (46) zu nennen. Sie steuert Enzymaktivitäten (8), interagiert mit Transkriptionsfaktoren (41, 158), reguliert die Hormonausschüttung (86, 140) und spielt eine Rolle bei der Zellvolumenregulation (121, 145), -proliferation (21, 58) und bei der Apoptose (19, 127).

Studien weisen zusätzlich darauf hin, dass die SGK1 bei der moderaten arteriellen Hypertonie (22, 23), beim metabolischen Syndrom (46, 120), beim Tumorwachstum (29, 31, 117), bei Neurodegeneration (93) und bei Erkrankungen, die mit einer Fibrose einhergehen, wie beispielsweise die Lungenfibrose (142) oder die Leberzirrhose (57) eine Rolle spielt.

## 1.4 Das Gerüstprotein NHERF

Das Gerüstprotein NHERF („Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor“) wurde als Protein entdeckt, das eine wichtige Rolle bei der Phosphorylierung und Regulation des Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauschers durch die Protein Kinase A (PKA) spielt (151). Es existieren zwei Isoformen, NHERF1 und NHERF2, die zu 62 % Sequenzhomologie aufweisen. Die NHERF-Proteine besitzen zwei PDZ-

Domänen (PSD-95/Dlg/ZO-1). Diese Domänen wurden zum ersten Mal 1991 beschrieben. Ihren Namen verdankt die Domäne den Proteinen, in denen sie zuerst gefunden wurde. Dazu gehört das synaptische Protein PSD-95/SAP-90, das Septate junction-Protein Discs large aus *Drosophila melanogaster* und das Tight junction-Protein Zonula occludentes-1. Die PDZ-Domäne ist eine Protein-Protein Interaktions-Domäne aus 80-90 AS. Sie bindet an Tetrapeptidsequenzen, die am C-Terminus des Zielproteins (X-S/T-X-V/L) liegen (54, 67, 124, 132). Neben diesem typischen C-terminalen PDZ-Bindemotiv können PDZ-Domänen auch mit internen Sequenzen interagieren, die eine Haarnadel bilden und damit ein freies C-terminales Ende vortäuschen (38, 70). So zeigt der  $K_v1.5$  sowohl das typische C-terminale PDZ-Bindemotiv als auch das interne PDZ-Bindemotiv im Bereich des N-Terminus (50).

Die beiden Isoformen, NHERF1 und NHERF2 können in der Nähe der Zelloberfläche lokalisiert werden und stabilisieren dabei Ionenkanäle in der Plasmamembran (13, 52, 111). Die NHERF-Proteine spielen eine wichtige Rolle im Trafficking von Membranproteinen. Sie nehmen an der Steuerung des Transports von Membranproteinen aus ihren endosomalen Vesikeln an die Plasmamembran teil oder steuern ihre Internalisierung und die danach folgende Degradation in Lysosomen.

Wie bereits erwähnt, besitzen die beiden Isoformen zwei PDZ-Domänen und zudem eine ERM-Bindungsdomäne. Mittels dieser ERM-Domäne können Proteine des Zytoskellets gebunden werden, die Mitglied der Ezrin-Radixin-Moesin-Merlin-Familie sind (157). Obwohl beide NHERF-Isoformen große Sequenzhomologie aufweisen, erkennen sie unterschiedliche Zielproteine, um entweder zwei Proteine in räumliche Nähe zueinander zu bringen oder um sie am Zytoskellet zu verankern (129). In Epithelzellen, die über einen apikalen und einen basalen Pol verfügen, ist die ortsspezifische Lokalisation zumindest teilweise auf ihre Assoziation mit dem Zytoskellet zurückzuführen (26). So ist das PDZ-Bindemotiv im CFTR („Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator“) notwendig, damit er am apikalen Pol exprimiert wird. Ein Verlust des Bindemotivs führt dazu, dass der CFTR am basalen Pol exprimiert wird und

damit nicht mehr seiner Funktion nachgehen kann (103, 131). Außerdem steht NHERF2 auch im Dienste der zellulären Signaltransduktion. So bringt NHERF2 die PKA durch die Bindung an Ezrin in räumliche Nähe zum CFTR und ermöglicht dadurch die Aktivierung des Kanals durch die Kinase (137). Eine ähnliche Rolle spielt NHERF2 bei der Regulation des Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauschers 3 durch die PKA (150). NHERF2 bindet aber auch an andere Proteinkinasen als an die PKA, so auch an die SGK1 um die Modulation von verschiedenen Ionenkanälen, wie z.B. des K<sup>+</sup>-Kanals ROMK (156) oder des epithelialen Ca<sup>2+</sup>-Kanals TRPV5 (52, 111) zu ermöglichen.

### **1.5 Die Ubiquitinligase Nedd4**

Die Ubiquitinierung von Proteinen bildet einen essentiellen Schritt in der Degradation von intrazellulären Proteinen. Dieser hochselektive Prozess funktioniert unter anderem durch die Konjugation der zu prozessierenden Proteine mit mehreren Ubiquitinmolekülen. Diese ubiquitinierten Proteine werden dann durch den 26S Protease Komplex abgebaut. Der katalytische Kern des Komplexes wird auch Proteasom genannt (32). Die kovalente Bindung von Ubiquitin, ein Polypeptid aus 76 Aminosäuren, an Lysinreste des Zielproteins wird für die Degradation im Proteasom benötigt (77). Für die Ubiquitinierung ist eine Enzymkaskade erforderlich, die über drei Klassen von Enzymen verfügt. Dazu gehört das Enzym E1 zur Aktivierung des Ubiquitins, E2 zur Konjugation des Ubiquitins und E3 als Ubiquitinligase. Das erste Enzym E1, aktiviert das Ubiquitin, sodass E2 direkt Ubiquitin an das Zielprotein transferiert oder dieses aktivierte Molekül auf das Enzym E3 übertragen kann. E3 katalysiert dann die kovalente Verbindung des carboxyterminalen Glycin des Ubiquitin mit der ε-Aminogruppe von Lysinresten am Zielprotein. Das Enzym E3 wird verdächtigt spezifische Zielproteine zu erkennen, die nicht alleine durch E2 ubiquitiniert werden (6).

Das „Human associated protein“ (E6AP) ist ein E3 Enzym, das identifiziert wurde als eine Ubiquitinligase des Tumorsuppressorproteins p53 in Zusammenhang mit humanen Papillomviren Typ 16 und 18 (75, 123). Andere

mögliche E3 Enzyme besitzen eine konservierte Region von ungefähr 360 Aminosäuren, die große Ähnlichkeit aufweisen zum C-Terminus von E6AP. Daher wird diese Domäne HECT-Domäne („homologous to E6AP carboxyl-terminus“) genannt (74). Die Ubiquitinligase Nedd4 (NPC (neuronal precursor cell) expressed, developmentally down-regulated 4) ist solch ein HECT-E3 Enzym (105). Es konnte gezeigt werden, dass die Ubiquitinligase unter anderem den Ionenkanal ENaC (1, 55) und den Aminosäuretransporter EAAT1 (14) regulieren kann. Sie wurde 1992 als ein Gen identifiziert, das im frühen Embryonalstadium der Maus im zentralen Nervensystem in hohem Maße exprimiert wird. Mittlerweile weiss man jedoch, dass die Expression nicht nur auf das embryonale ZNS (90) beschränkt ist. Sie wird mitunter auch in der Niere (82), der Lunge und in der Leber (6) exprimiert.

Es existieren zwei Isoformen der Nedd4: Nedd4-1 und Nedd4-2. Nedd4-1 besitzt eine N-terminale kalziumabhängige Lipidbindedomäne (C2), eine HECT-Domäne und drei bis vier WW-Domänen. Diese WW-Domänen haben zwei hoch konservierte Tryptophanreste und einen konservierten Prolinrest bei einer Sequenzlänge von etwa 35 Aminosäuren. WW-Domänen binden vornehmlich an kleine prolinreiche Sequenzen, so genannte PY-Motive. Es besteht aus P-P-X-Y (125). Inzwischen sind jedoch auch andere Sequenzen bekannt geworden, über die Nedd4 auf ihre Ziele wirkt (P-X-P-P-Y, P-P-L-P) (81, 83). Die HECT-Domäne stellt die katalytische Region dar (123). Die Nedd4-2 verfügt im Organismus der Ratte und der Maus über drei WW-Domänen, wobei im Menschen vier WW-Domänen vorherrschen. Zudem besitzt die Nedd4-2 mehrere SGK1-Konsensussequenzen. Die Phosphorylierung im Bereich dieser Sequenzen führt zu einer Verminderung der Nedd4-2-Interaktion mit ihrem Zielprotein, was im Umkehrschluss eine indirekten Stimulation durch die SGK1 bedeutet. Dieser Mechanismus wurde bereits bei dem Aminosäuretransporter EAAT4 (17) und dem epithelialen Natriumkanal (ENaC) (42) gezeigt. Eine Störung der SGK1-Konsensussequenzen führt zu einer „SGK1-immunen“ Mutante (<sup>S382A</sup><sup>S468A</sup>Nedd4-2), die nicht mehr durch die SGK1 inhibiert werden kann.

## 1.6 Fragestellung der Arbeit

Ein erhöhter Blutglucosespiegel führt in pankreatischen Betazellen dazu, dass ATP-sensitive  $K^+$ -Kanäle inaktiviert werden, was zur Depolarisation der Zelle mit anschließendem Kalzium-Einstrom durch spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle führt. Eine Erhöhung des intrazellulären Kalziums wiederum führt zur Insulinsekretion durch die Fusion der insulinhaltigen Vesikel mit der Plasmamembran in den Betazellen (119). Verschiedene Studien haben gezeigt, wie wichtig die Regulation des Membranpotentials durch spannungsabhängige Kalium-Kanäle ( $K_V$ ) in den pankreatischen Betazellen ist (96, 97, 114, 136). So verstärkt die Blockade von  $K_V$ -Kanälen die Insulinfreisetzung bei Erhöhung der Glucose in pankreatischen Betazellen. Glukokortikoide tragen zu der Entstehung eines Diabetes mellitus teilweise dadurch bei, dass sie die Insulinsekretion der Betazellen reduzieren (44, 92, 115). Bei der durch Dexamethason induzierten Hemmung der Insulinsekretion spielt die von Glukokortikoiden abhängige Genexpression zumindest teilweise eine Rolle, da unter dem Einfluss des Glukokortikoidrezeptorantagonisten Mifepriston der Effekt des Dexamethason verloren geht (44, 92). Zu den Genen, die durch Dexamethason reguliert werden, gehört unter anderem die Serum- und Glukokortikoid induzierbare Kinase 1 (SGK1) (149). Die Menge an Transkript und Protein der SGK1 ist unter Dexamethason erhöht. So zeigt sich bei SGK1 knockout Mäusen, dass Dexamethason keine Wirkung auf die Insulinsekretion hat (140). Die Wirkung der SGK1 ist zumindest teilweise auf die Aktivierung des spannungsabhängigen Kaliumkanals  $K_V1.5$  zurückzuführen. Eine erhöhte Aktivität des  $K_V1.5$  vermindert den Eintritt von  $Ca^{2+}$ -Ionen durch spannungsabhängige Kalziumkanäle. Durch die verminderte  $Ca^{2+}$ -Konzentration kommt es zu einer geringeren Insulinsekretion aus den pankreatischen Betazellen (140). Der zu Grunde liegende Mechanismus der Regulation des  $K_V1.5$  durch die SGK1 ist jedoch noch immer unbekannt.

Der spannungsabhängige Kaliumkanal  $K_V1.5$  ist aber nicht nur in pankreatischen Betazellen, sondern auch in vielen anderen Geweben, so im Herz (56, 60), im Gehirn (56), in Makrophagen (141), und in glatten Muskelzellen (2, 7, 101, 107) exprimiert. Die spezielle Lokalisation von  $K_V$ -

Kanälen ist teilweise auf ihre Assoziation mit PDZ-Domänen tragenden Proteinen zurückzuführen. Ob eine Interaktion des  $K_v1.5$  mit den NHERF1/2 Isoformen besteht, ist bisweilen unklar. Wie bereits erwähnt, verfügt auch die SGK1 über PDZ-Bindemotive. In wieweit diese bei der Regulation des  $K_v1.5$  in Zusammenhang mit der SGK1 eine Rolle spielen, ist derzeit noch nicht erforscht.

Aus diesem Vorwissen lassen sich folgende Fragestellungen formulieren:

1. Welcher molekulare Mechanismus liegt dem stimulativen Effekt der SGK1 auf den  $K_v1.5$  zu Grunde?
2. Haben die Isoformen NHERF1/2 einen Einfluss auf den  $K_v1.5$  und wenn ja, welcher molekulare Mechanismus verbirgt sich dahinter?
3. Zeigen die Isoformen NHERF1/2 und die SGK1 einen synergistischen Effekt auf den  $K_v1.5$ ?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Lösungen und Substanzen

#### Kollagenase

Kollagenasen sind Enzyme, die Peptidbindungen zwischen Prolin und anderen Aminosäuren spalten. Bei der Präparation der Oozyten wurde Kollagenase von *Clostridium histolyticum* (Collagenase, Type: CLS II, Biochrom AG, Deutschland) eingesetzt, um die Oozyten aus ihrem Verbund herauszulösen. Dazu wurden die Kollagenase in der Konzentration 2g/l OR-2 verwendet.

#### OR-2

Die OR-2-Lösung wurde bei der Präparation der Oozyten zum Waschen und als Lösungsmittel der Kollagenase verwendet. Sie ähnelt der ND 96-Lösung, ist allerdings frei von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, die die Aktivität der Kollagenase mindern würden.

Substanz	Konzentration
NaCl	82,5 mM
KCl	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
Tris-Hepes	5 mM

Tabelle 1: Zusammensetzung des OR-2; pH 7,6

Als Puffer wurde Tris-Hepes (Tris-(hydroxymethyl)-Aminoethan-N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonat) (pKs 7,4) verwendet.

## ND 96

ND 96 wurde unter anderem als Perfusionslösung während der elektrophysiologischen Messung verwendet und stellte die Grundlage für die Aufbewahrungslösung der Oozyten dar.

Substanz	Konzentration
NaCl	96 mM
KCl	2 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,8 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
Tris-Hepes	5 mM

Tabelle 2: Zusammensetzung des ND 96; pH 7,4

## ND 96–Oozytenaufbewahrungslösung

Die Oozyten wurden zur Aufbewahrung in ND 96-Lösung gelagert, die zusätzlich mit Gentamycin, Theophyllin und Natriumpyruvat versetzt war.

Substanz	Konzentration
NaCl	96 mM
KCl	2 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,8 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
Tris-Hepes	5 mM
Natriumpyruvat	2,5 mM
Theophyllin	0,5 mM
Gentamycin	50 µg/l

Tabelle 3: Zusammensetzung der ND 96-Oozytenaufbewahrungslösung; pH 7,4; Osmolarität 200 mOsm

## **Brefeldin A**

Brefeldin A ist ein Antibiotikum aus dem Pilz *Eupenicillium brefeldianum* und stört den anterograden Proteintransport vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat. Es wurde als anti-viraler Wirkstoff entdeckt (139), wird heutzutage jedoch hauptsächlich in der Erforschung von intrazellulärem Proteintransport verwendet. Die Oozyten wurden mit 5  $\mu$ M Brefeldin A inkubiert.

## **2.2 Expression in *Xenopus laevis* Oozyten**

### **2.2.1 Allgemeines**

Die Oozyten des Südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* sind ein weit verbreitetes System zur Expression heterologer Proteine. Vor allem die funktionelle Charakterisierung von Proteinen und im Speziellen von Ionenkanälen und Membrantransportern wurde durch die Möglichkeit, die die Oozyten bieten, vorangetrieben. Durch den Durchmesser von 1,0-1,3 mm ist es relativ einfach möglich mittels einer Mikrokapillare cRNA in die Oozyte zu injizieren. Die dann exprimierten Proteine können im Folgenden mit den verschiedensten Techniken untersucht werden. Neben der Fähigkeit aus injizierter cRNA Proteine zu synthetisieren, bietet die Oozyte des *Xenopus laevis* noch andere Vorteile: *Xenopus laevis* kann einfach gehalten und gezüchtet werden und demnach zu günstigen Preisen bezogen werden (152). Die Oozyten sind widerstandsfähig gegenüber äußeren Einflüssen und mit den Substraten, die sie zum Überleben brauchen, ausgestattet. Aufgrund ihrer Unabhängigkeit vom äußeren Nahrungsangebot besitzen sie nur sehr wenig endogen exprimierte Membrantransporter (143). Dadurch zeigen sie bei Messungen nur ein sehr geringes Hintergrundsignal durch eigene Proteine und eignen sich sehr gut zur Untersuchung von Membrantransportern und Ionenkanälen, die sie durch die Injektion von cRNA heterolog exprimieren.

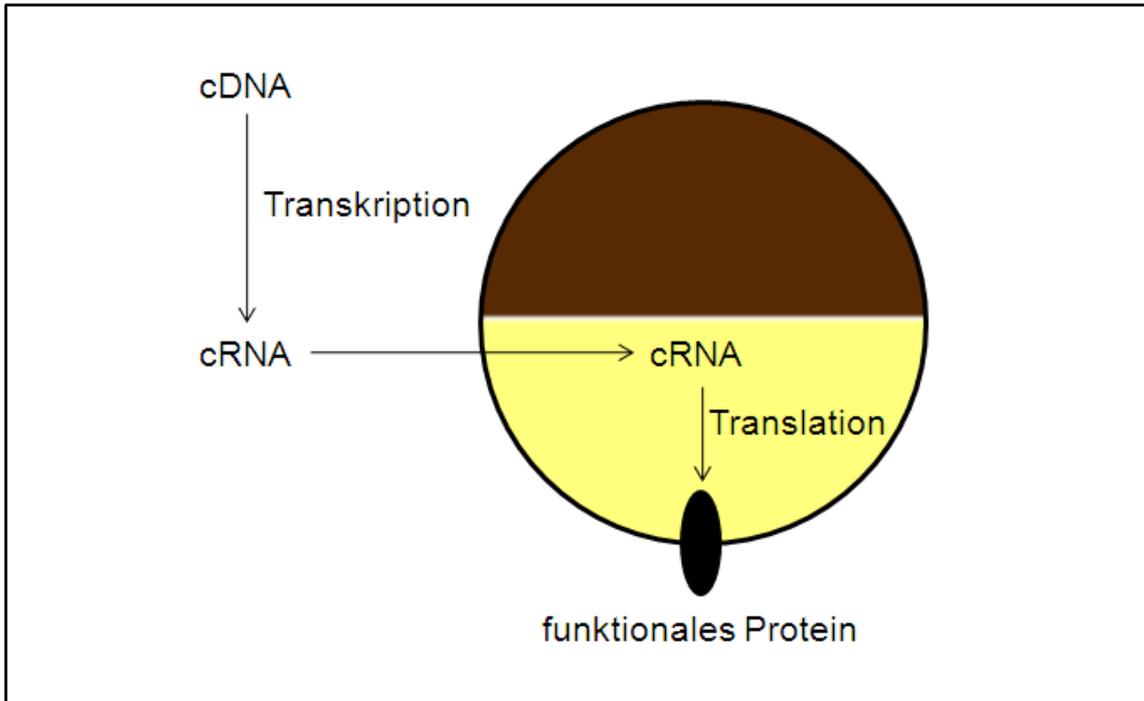


Abbildung 5: In vitro transkribierte cRNA wird mittels eines Mikroinjektors in die Oozyte injiziert und dort in funktionale Proteine translatiert. Modifiziert nach (79).

### 2.2.2 Oozytenpräparation

Die Oozyten wurden in einer Operation den Fröschen entnommen. Dazu legte man den Frosch für 20-30 Minuten zum Zweck der Anästhesie in eine Wanne, die mit einer 0,1 %igen 3-Aminobenzoessäureethylester-Lösung (Sigma, Deutschland) gefüllt worden war. Nach der Überprüfung des Schluckreflexes zur Sicherstellung der Anästhesie wurde das Tier mit dem Rücken auf Eis gelagert und der geplante Operationsbereich mit Povidon-Iod (Braunol, B. Braun, Deutschland) desinfiziert (Abbildung 6). Mit einer Stichinzision in die Haut von 1 cm Länge und einer Durchtrennung des darunterliegenden Muskels erreichte man die Ovarien des Frosches. Die benötigte Menge an Oozyten wurde dann entnommen (Abbildung 7). Anschließend verschloss man die Muskulatur und die Haut jeweils mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl 5-0, Ethicon, Johnson&Johnson, Belgien). Die entnommenen Oozyten wurden in OR-2 zwischengelagert (Abbildung 8) und der Frosch in ein Behältnis mit ausreichend Wasser gelegt, das jedoch nur so hoch stand, dass der Frosch

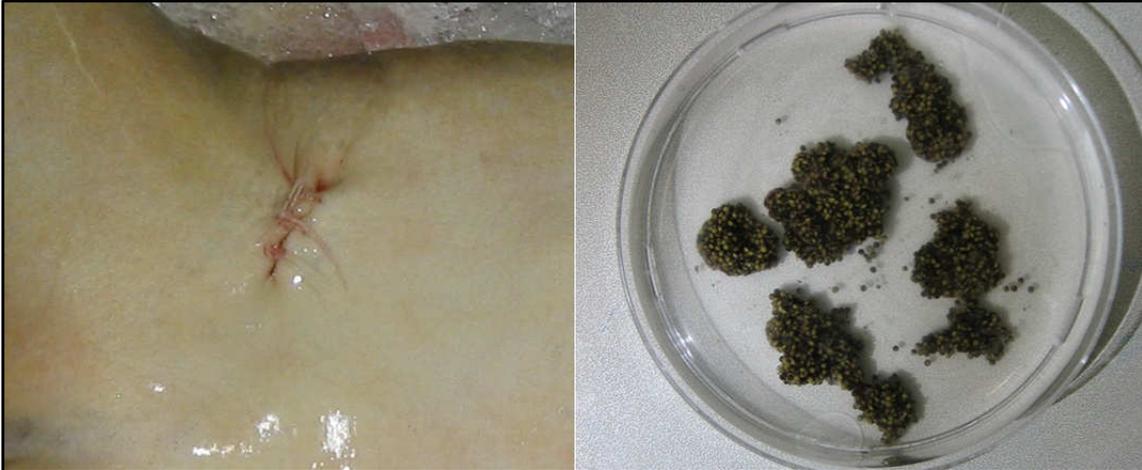
nicht ertrinken konnte. Nachdem der Frosch vollständig aus seiner Anästhesie erwacht war, wurde er zurück in sein Aquarium gesetzt.



Abbildung 6: *Xenopus laevis* in Wanne mit Anästhetikum (3-Aminobenzoessäureethylester 0,1%) (li.); für die Operation mit dem Rücken auf Eis gelagert (re.)



Abbildung 7: Schnittinzision in die Haut zur Entnahme der Oozyten (li.); aus dem Bauchraum mobilisierte Oozytenpakete auf Parafilm gebettet (re.)



**Abbildung 8: Verschluss der Operationswunde mittels chirurgischem Nahtmaterial (li.); Oozytenpakete nach der Entnahme in OR-2 zwischengelagert (re.)**

Die in OR-2-Lösung zwischengelagerten Oozyten wurden dann mit Hilfe feiner Pinzetten teilweise separiert, mit OR-2-Lösung zwischengespült und sogleich zur Entfernung der äußeren Bindegewebsschichten in der Kollagenaselösung für 1 Stunde inkubiert. Es folgte eine nochmalige Zwischenspülung mit OR-2-Lösung und eine weitere Inkubation in frischer Kollagenaselösung. Nach regelmäßigen Kontrollen unter der Stereolupe wurden die Oozyten nach 0,5 – 1 h aus der Lösung entnommen und mit ND 96 klar gespült. Dabei musste auf den richtigen Zeitpunkt der Entnahme geachtet werden, da ein zu langes Einwirken der Kollagenase zur Zerstörung der Oozyten geführt hätte. Nun wurden unter der Stereolupe die Oozyten heraus selektiert, die den Stadien V und VI nach Dumont (47) entsprachen (Abbildung 9). Diese Oozyten wurden bis zur Injektion der cRNA in Gruppen von 20 Zellen in Petrischalen bei 19 °C in ND 96-Aufbewahrungslösung gelagert.

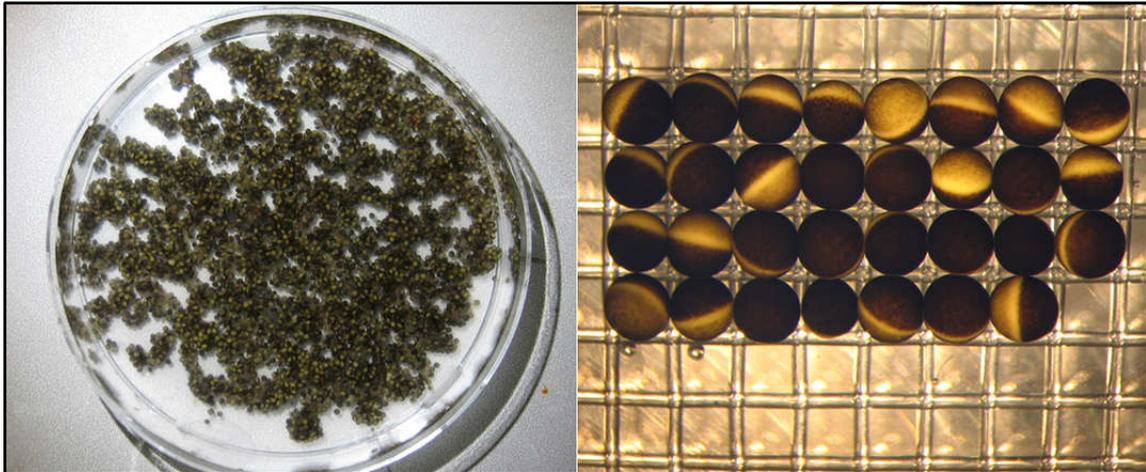


Abbildung 9: Vor dem Verdau mittels Kollagenase wurden die Oozytenpakete zerkleinert (li.); Selektierte Oozyten auf Netz aufgereiht (re.)

### 2.2.3 cRNA-Synthese

- (1) Die in-vitro cRNA-Synthese benötigte im Prinzip zwei Schritte: Zum einen die Linearisierung der Plasmid-DNA, die das eingefügte Gen des zu untersuchenden Proteins enthielt und zum anderen die eigentliche cRNA-Synthese.
- (2) Die eingefügte DNA sollte am 3'-Ende mittels eines Restriktionsenzym geschnitten werden. 10  $\mu\text{g}$  der Plasmid-DNA wurden mit 20 U Restriktionsenzym und 5  $\mu\text{g}$  10x Puffer bei einem endgültigen Volumen von 50  $\mu\text{l}$  bei 37  $^{\circ}\text{C}$  über Nacht inkubiert.
- (3) Um sicherzustellen, dass die Linearisierung geglückt war, wurde ein 5  $\mu\text{g}$  Aliquot entnommen und mittels Gelelektrophorese überprüft.
- (4) Anschließend wurde 50  $\mu\text{l}$  Isopropanol und 5  $\mu\text{l}$  von 3 M Natriumacetat hinzugefügt und für 10 Minuten inkubiert, um die DNA zum Ausfällen zu bringen.
- (5) Zur Gewinnung der ausgefällten DNA zentrifugierte man die Lösung für 15 min bei 17000 rpm bei 4  $^{\circ}\text{C}$ . Das DNA-Pellet wurde dann mit 70 %igem Ethanol gewaschen und wiederum für 5 Minuten bei 17000 rpm bei 4  $^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Nach der Trocknung des Pellets an der Luft, wurde es in 10  $\mu\text{l}$  DNAase freiem  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Die Konzentration der DNA bestimmte man photospektrometrisch.

- (6) 1 µg linearisierter DNA, 1 µl rNTPS (20 nM), 2,5 µl Cap Analogon, 1 µl RNAase-Inhibitor und 2,4 µl 10x Transkriptionspuffer wurden gemischt und zu 1 µl T7 Polymerase hinzugefügt. Die Lösung wurde dann für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl DNAase wurde die Lösung für weitere 15 Minuten unter ständigem schütteln weiter inkubiert. Dann gab man 100 µl DEPC-Wasser und 125 µl Phenolchloroform hinzu und zentrifugierte für 2 Minuten bei 13000 rpm.
- (7) Zur Aufreinigung der generierten RNA wurden 100 µl DEPC-Wasser und 125 µl Phenolchloroform zugegeben und die Lösung für 2 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die obere anorganische Phase wurde dann mit Vorsicht entnommen und mit 12,5 µl 3 M Natriumacetat und 375 µl Ethanol in ein neues Eppendorf-Gefäß gefüllt, gemischt und bei 70 °C über Nacht inkubiert.
- (8) Nach erfolgter Inkubation erfolgte die erneute Zentrifugation mit 17000 rpm für 15 Minuten bei 4 °C. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 200 µl Ethanol gewaschen. Zum Schluss wurde das Pellet an der Luft getrocknet und in 25 µl DEPC-Wasser gelöst. Zur Konzentrationsbestimmung wurde ein Biophotometer (Eppendorf, Germany) benutzt. Zusätzlich wurde die Qualität der RNA mittels Gelelektrophorese überprüft.

### **2.2.4 cRNA-Injektion**

Die Injektion der synthetisierten cRNA erfolgte mittels eines Mikroinjektors (WPI, Sarasota, USA), der mit Hilfe eines Manipulators gezielt gesteuert werden konnte. Zur Verdünnung der cRNA wurde DEPC-Wasser verwendet, so dass die RNA vor RNAasen weitgehend geschützt war. Die verdünnte cRNA wurde mit Glaskapillaren (WPI, Sarasota, USA) injiziert, die mit einem Mikroelektrodenpuller (DMZ-Universal-Puller, Zeitz, Augsburg) so gezogen wurden, dass sie eine sehr fein zulaufende Spitze aufwiesen. Die Spitze der gezogenen Glaskapillaren wurde unter dem Mikroskop von Hand mittels einer feinen Schere abgeschnitten, so dass sich eine Öffnung von 10-20 µm ergab.

Anschließend füllte man die Kapillare mit Paraffinöl, um sie gegen eindringende Luft zu versiegeln. Nun wurde die zuvor verdünnte cRNA in die Kapillare mit Hilfe des Mikroinjektors aufgezogen. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine Luft einschüsse vorhanden waren, da dies die Menge der später injizierten Menge an cRNA hätte verfälschen können. Die zu injizierenden Oozyten wurden in eine Petrischale mit ND 96 gegeben, die am Boden mit einem Netz ausgestattet war, so dass die Oozyten bei der Injektion nicht verrutschen konnten. Pro Oozyte wurden 27,6 nl cRNA mittels Mikroinjektor injiziert. Die Konzentration der injizierten cRNA ist, wenn nicht anders erwähnt, der Tabelle 4 zu entnehmen. Nach der Injektion bewahrte man die Zellen wieder in ND 96-Aufbewahrungsmedium auf. Dieses Medium wurde täglich gewechselt und beschädigte Oozyten wurden aussortiert um das Überleben der restlichen Oozyten zu maximieren.

cRNA	Menge der injizierten cRNA pro Zelle
K <sub>V</sub> 1.5	0,75 ng
<sup>T56A</sup> K <sub>V</sub> 1.5	0,75 ng
<sup>S81A</sup> K <sub>V</sub> 1.5	0,75 ng
<sup>S535A</sup> K <sub>V</sub> 1.5	0,75 ng
<sup>S569A</sup> K <sub>V</sub> 1.5	0,75 ng
<sup>4x</sup> K <sub>V</sub> 1.5	0,75 ng
K <sub>V</sub> 1.3	0,07 ng
<sup>S442D</sup> SGK1	7,50 ng
NHERF1	12,50 ng
NHERF2	12,50 ng
NHERF2ΔP1	12,50 ng
NHERF2ΔP2	12,50 ng
Nedd4-2	1,25 ng
<sup>C962S</sup> Nedd4-2	1,25 ng
<sup>S382AS468A</sup> Nedd4-2	1,25 ng

Tabelle 4: Menge der injizierten cRNA

## 2.3 Elektrophysiologische Messungen

### 2.3.1 Versuchsaufbau

Vier Tage nach der Injektion der cRNA wurden die elektrophysiologischen Messungen bei Raumtemperatur vorgenommen. Dazu wurden die Oozyten in eine Messkammer aus Kunststoff eingelegt, die konstant mit ND 96 mit 20 ml/min durchflossen wurde. Ein kompletter Austausch der Messkammerlösung war mittels eines Schwerkraftperfusors in ungefähr 10 Sekunden erreicht. Durch Mikromanipulatoren bewegte man die Mikroelektroden. Die Mikroelektroden wurden mittels einem Mikroelektrodenpuller (DMZ-Universal-Puller, Zeitz, Augsburg) aus Borosilikatglaskapillaren (Typ GC150TF-7.5, 1,5 mm Außendurchmesser, 1,17 mm Innendurchmesser; Harvard apparatus LTD, Kent, Groß Britannien) hergestellt. Sie wurden mit 3 M KCl-Lösung gefüllt und

über einen chlorierten Silberdraht gestülpt, der mit dem Vorverstärker (HS-2A Headstage, Axon Instruments, USA) verbunden war. Mittels Verstärker (GeneClamp 500, Axon Instruments, USA), Analog/Digital-Wandler (Digidata 1322A, Axon Instruments, USA) und Computersoftware (pClamp 9.0, Axon Instruments, USA) konnten die von den Mikroelektroden aufgenommenen Ströme gemessen und visualisiert werden. Um Störungen zu minimieren, wurden sämtliche Geräte, die sich innerhalb des Faradayschen Käfigs befanden, einzeln geerdet. Die Experimente wurden mindestens drei Mal mit verschiedenen Oozytenpräparationen und Fröschen durchgeführt. Unter den einzelnen Messungen wurden zwar quantitative, jedoch keine qualitativen Unterschiede beobachtet.

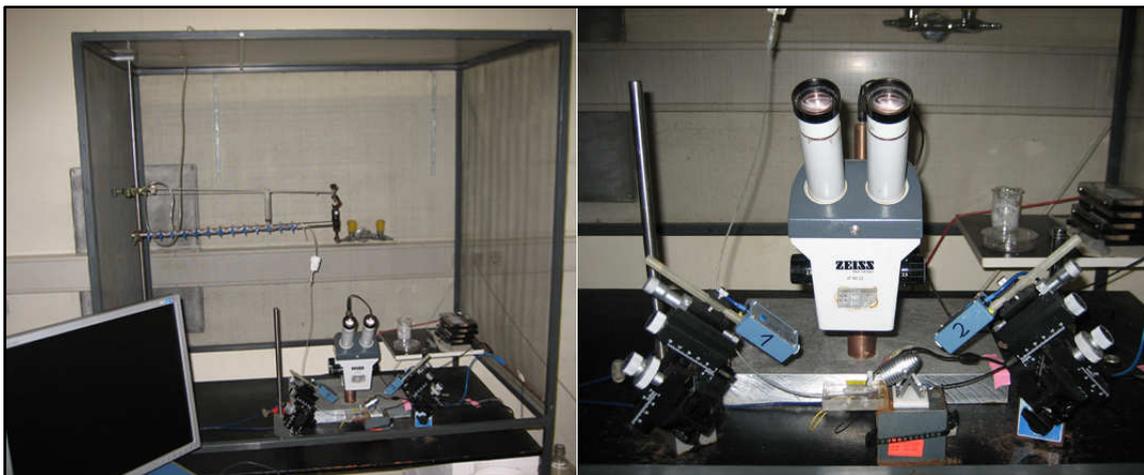
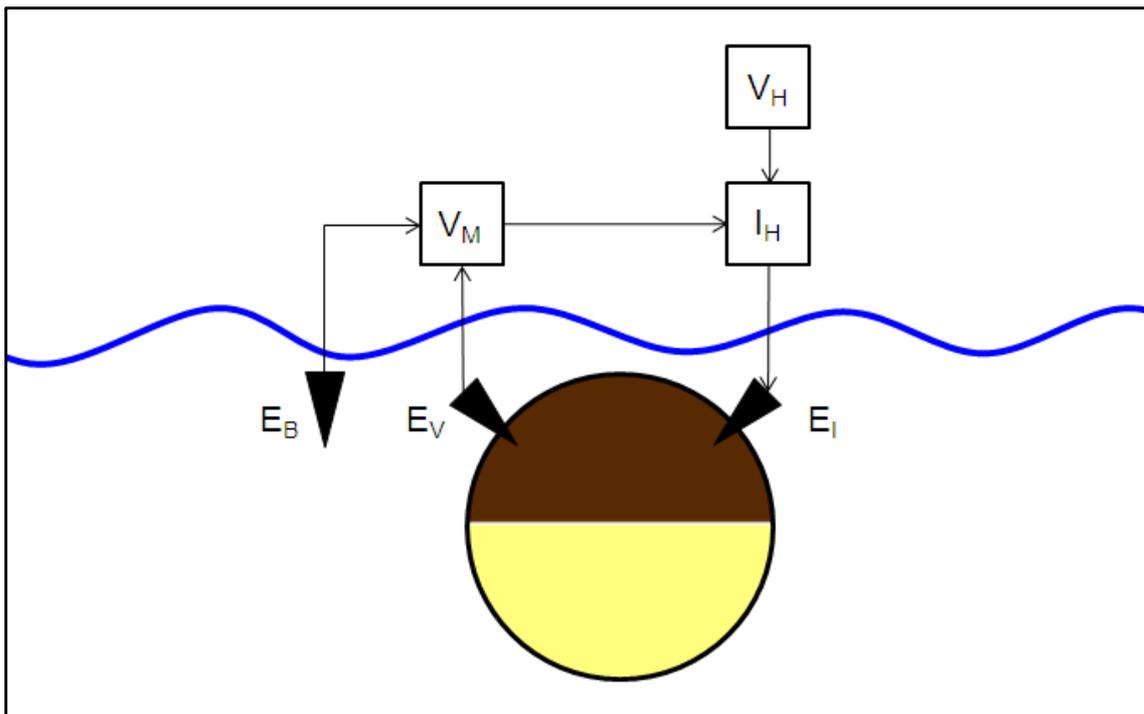


Abbildung 10: Elektrophysiologischer Messplatz für die Voltage-Clamp-Messung

### 2.3.2 Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp

Bei der Voltage-Clamp-Methode hat der Untersucher die Möglichkeit, das Membranpotential der Zelle auf einen bestimmten Wert festzulegen, d.h. zu klemmen. Auf dieser Grundlage aufbauend, wird es ihm ermöglicht den transmembranären Strom zu messen und damit Rückschlüsse auf die Aktivität einzelner Ionenkanäle und Membrantransporter zu ziehen.

Dazu werden zwei intrazelluläre Ableitungen benötigt. Die erste Elektrode, die Spannungselektrode  $E_V$  misst gegenüber der Badelektrode  $E_B$  das aktuelle Membranpotential ( $V_M$ ) der Zelle. Die zweite Elektrode, die Stromelektrode  $E_I$ , appliziert den Haltestrom ( $I_H$ ) in die Zelle, um das vom Untersucher festgelegte Membranpotential ( $V_H$ ) zu erreichen. Der Haltestrom ( $I_H$ ) ergibt sich aus der Differenz von  $V_M - V_H$ . Diesen Vorgang bezeichnet man als Spannungsklemme. Der applizierte Strom wird gemessen und gibt den transmembranären Strom wieder, der über die Zellmembran fließt. Dabei entspricht ein negativer Strom nach Konvention einem Einstrom positiver Ionen. Bei Aktivierung eines Ionenkanals verändert sich der Betrag des Haltestrom ( $I_H$ ), der benötigt wird, um das eingestellte Membranpotential ( $V_H$ ) aufrecht zu erhalten. Die Veränderung dient als Maß für die Ionenkanalaktivität.



**Abbildung 11: Schematische Darstellung der Voltage-Clamp-Methode.** Badelektrode ( $E_B$ ), Spannungselektrode ( $E_V$ ), Stromelektrode ( $E_I$ ), aktuelles Membranpotential ( $V_M$ ), vom Untersucher festgelegtes Membranpotential ( $V_H$ ), Haltestrom ( $I_H$ )

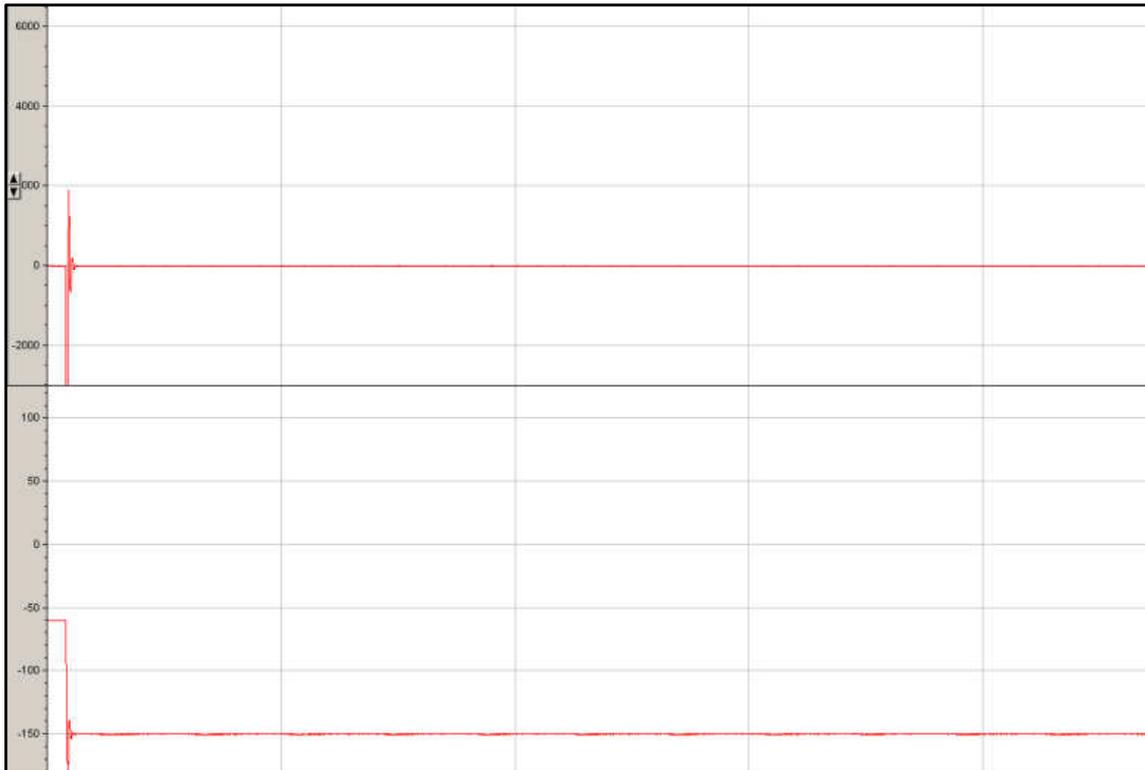
### 2.3.3 Ausführung der Experimente

Nach Einlegen der Oozyte in die Messkammer wurden die Elektroden ebenfalls in die Messkammer getaucht, anschließend der Widerstand der Elektroden überprüft und die Elektroden genullt. Dann wurde mit den Elektroden in die Zelle eingestochen bis sich eine Änderung des gemessenen Potentials entsprechend dem Ruhemembranpotentials der Oozyten zeigte. Es wurde in den Voltage-Clamp-Modus gewechselt, d.h. die Zelle auf  $V = -60$  mV geklemmt. Daraufhin begann man mit dem Programm Clampex (Axon Instruments, USA) die Messung (Aquisitionsrate von 10kHz). Da der  $K_{V1.5}$  einen spannungsabhängigen Kaliumkanal darstellt, wurde ein Protokoll gewählt, das bei  $V = -150$  mV beginnend in 10 mV-Schritten bis  $V = +50$  mV eine vollständige Aktivierung des Kanals erbrachte. Ein Ablauf einer Originalmessung ist in Abbildung 12 - Abbildung 14 dargestellt. Nach Beendigung des Protokolls wurde der Voltage-Clamp-Modus verlassen und die nächste Zelle in die Messkammer eingelegt.

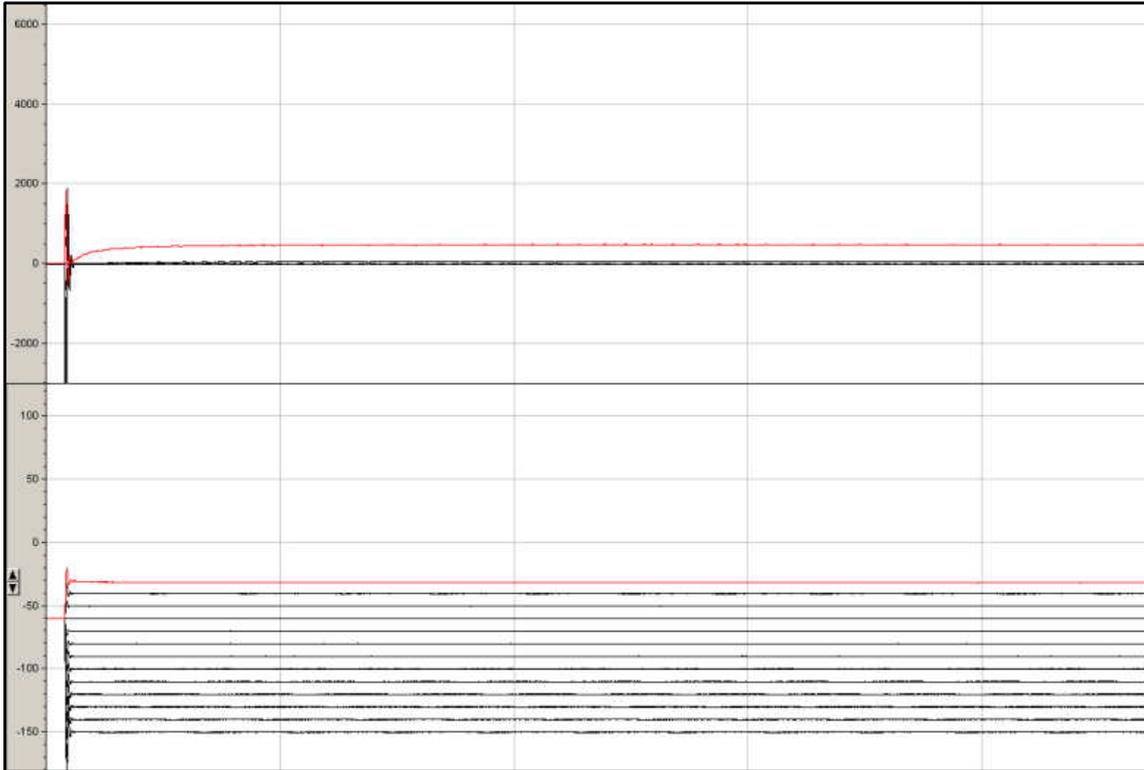
Das Maß für die Aktivierungskinetiken des  $K_{V1.5}$  war der maximale Strom während einem -60 mV Test-Puls, der gefolgt wurde von 200 ms dauernden Pulsen von  $V = -50$  mV bis  $V = +50$  mV.

Die Inaktivierung wurde mittels einem aus zwei Pulsen bestehenden Protokoll bestimmt, wobei sich der erste 1 s dauernde Puls von  $V = -60$  mV bis  $V = +40$  mV erstreckte und gefolgt wurde von dem zweiten 200 ms dauernden Puls bis  $V = +70$  mV.

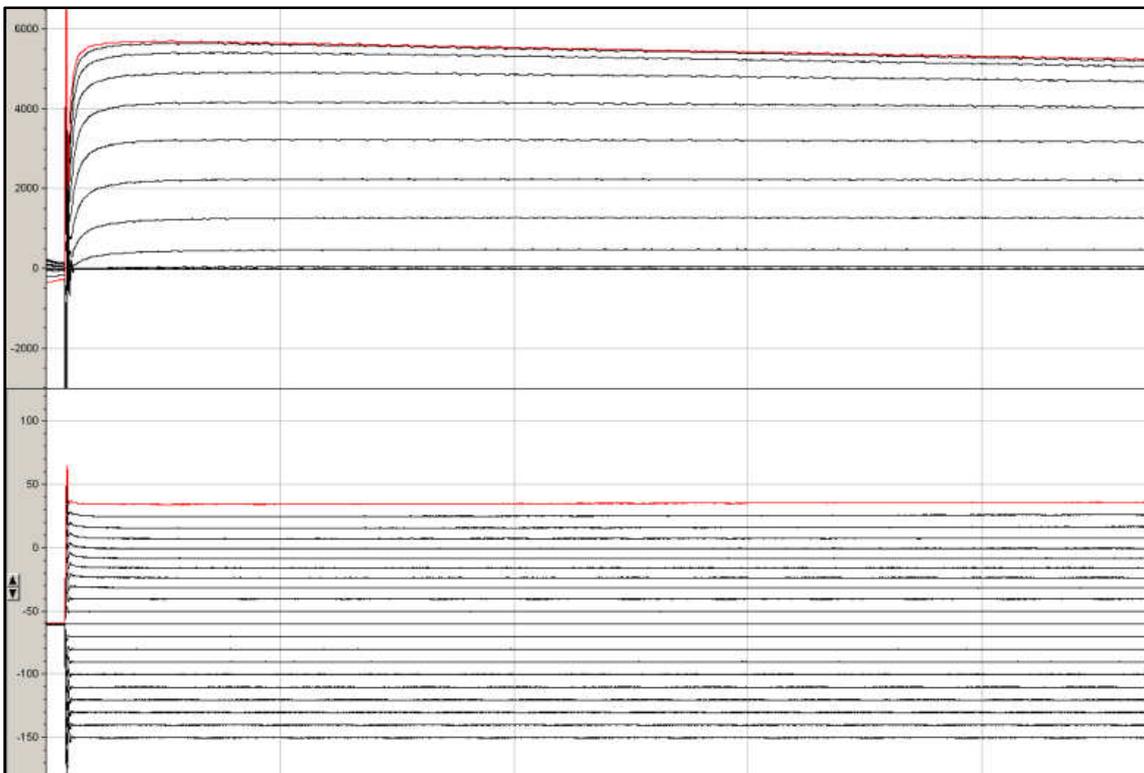
Für die Brefeldin A-Versuche wurden die Oozyten vor der Messung in Brefeldin A (5  $\mu$ M) vorinkubiert. Zu den in Abbildung 26 gezeigten Zeitpunkten wurden einzelne Zellen entnommen und mittels Voltage-Clamp-Technik gemessen.



**Abbildung 12: Originalbild der Voltage-Clamp-Messung in der Clampex Software.** Darstellung mit digitaler Filterung. Gezeigt ist der erste Puls. Im oberen Bildabschnitt ist der Strom, im unteren die Spannung aufgetragen. Es zeigt sich bei einer Spannung von  $V = -150 \text{ mV}$  keine Aktivierung des  $K_{v1.5}$ .



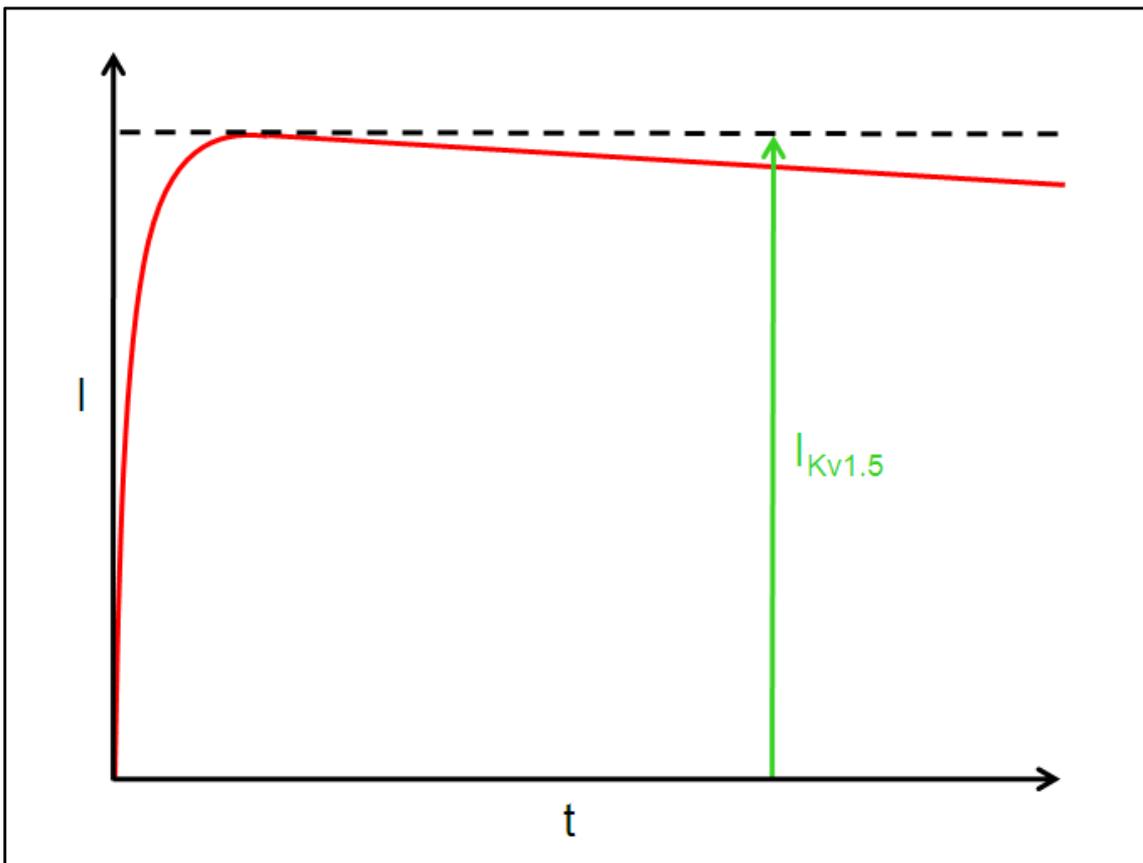
**Abbildung 13: Originalbild der Voltage-Clamp-Messung in der Clampex Software.** Darstellung mit digitaler Filterung. Bei Ablauf des 13. Pulses beginnt sich der  $K_{V1.5}$  bei  $V = -30$  mV zu öffnen.



**Abbildung 14: Originalbild der Voltage-Clamp-Messung in der Clampex Software.** Darstellung mit digitaler Filterung. Bei dem hier gezeigten 21. Puls ist die maximale Aktivierung des  $K_{V1.5}$  erreicht.

### 2.3.4 Auswertung und Statistik

Zur Auswertung der elektrophysiologischen Messung wurde das Programm Clampfit (Axon Instruments, USA) benutzt. Der Betrag des 20. Sweeps, d.h. des 20. Puls einer Messung wurde als Strom für die Statistik herangezogen.



**Abbildung 15: Schematische Darstellung der Auswertung des  $K_v1.5$ -Stromes.** Der maximale Betrag des 20. Sweeps wurde in Clampfit ausgewertet. I (Strom), t (Zeit),  $I_{Kv1.5}$  (ausgewerteter Strom des  $K_v1.5$ )

Die Daten zeigen den arithmetischen Mittelwert und den Standardfehler (SEM). „n“ gibt dabei die Anzahl der untersuchten Oozyten wieder. Alle Experimente wurden mit Oozyten von mindestens drei unterschiedlichen Fröschen wiederholt. Alle Werte wurden mittels ANOVA auf Signifikanz geprüft und nur

Werte mit  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen und entsprechend gekennzeichnet.

### **2.4 Western-Blot**

Zum Nachweis der in den Oozyten exprimierten Proteine wurden „Western-Blots“ angefertigt. Dazu wurden die Oozyten mittels Lyse Puffer (50 mM Tris, 0,5 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 100 mM NaCl, 1 % Triton x-100, 100  $\mu$ M Natriumorthovanadiumsäure und einem Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Mannheim)) lysiert. Die Proteine wurden dann auf einem 8 % Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Nach dem Blockieren mit fettfreier Milch inkubierte man die Blots über Nacht mittels der jeweiligen Antikörper (Tabelle 5). Die sekundären Peroxidase konjugierten anti-IgG-Antikörper wurden für die Detektion mittels Chemilumineszenz benutzt. Gearbeitet wurde mit dem „enhanced chemiluminescent ECL kit“ (Amersham, Freiburg).

Zur Bestimmung der Expression des  $K_v1.5$  in der Plasmamembran präparierte man zuerst die Membranen (9). Die gewonnenen Pellets wurden in SDS Probenpuffer gelöst, in ein 8 % Polyacrylamidgel geladen und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen bei 100 V für 60 min. Für den Immunoblot wurde ein anti- $K_v1.5$  Antikörper (Tabelle 5) benutzt. Nach dem Blockieren mit fettfreier Milch wurden die Blots wieder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Wiederum verwendete man als sekundärer Antikörper ein anti-Kaninchen IgG-Antikörper und. Die Intensität der Banden wurde mit Hilfe der Quantity One Analysis Software (Biorad, München) quantifiziert.

Antigen	Antikörper
<b>SGK1</b>	Rabbit anti-SGK1 (Upstate, Waltham, Ma, USA)
<b>NHERF1</b>	Rabbit anti-NHERF1 (Alomone labs, Jerusalem, Israel)
<b>NHERF2</b>	Rabbit anti-S-tag-HRP (Merck, Darmstadt)
<b>K<sub>v</sub>1.5</b>	Rabbit anti-K <sub>v</sub> 1.5 (Sigma, St.Louis, MO, USA)
<b>Phospho-Serin/Threonin</b>	Rabbit anti-phospho (Ser/Thr) 110B7E (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)
<b>Ubiquitin</b>	Mouse anti-ubiquitin (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)

Tabelle 5: Antikörper für Westernblotting / Coimmunopräzipitation

## 2.5 Zielgerichtete Mutagenese

Die neu zu generierenden Mutanten des K<sub>v</sub>1.5 wurden mittels zielgerichteter Mutagenese hergestellt. Dazu wurde das „QuikChange site-directed mutagenesis kit“ (Stratagene, Heidelberg) entsprechend der Anweisungen des Herstellers verwendet. Für die Mutanten, denen das N-terminale (K<sub>v</sub>1.5ΔN, AS 123-126) bzw. das C-terminale Ende (K<sub>v</sub>1.5ΔC, AS 598-601) fehlen sollte, wurden die Primer entsprechend Tabelle 6 benutzt. Die Primer zur Herstellung der Mutanten <sup>T56A</sup>K<sub>v</sub>1.5, <sup>S81A</sup>K<sub>v</sub>1.5, <sup>S535A</sup>K<sub>v</sub>1.5, <sup>S569A</sup>K<sub>v</sub>1.5 sind ebenso in der Tabelle 6 aufgeführt. Die <sup>4x</sup>K<sub>v</sub>1.5 Mutante wurde ausschließlich mittels der sense Primer hergestellt. Die Mutanten der SGK1 (<sup>S422D</sup>SGK1), des NHERF2 (NHERF2ΔP1, NHERF2ΔP2) und der Nedd4-2 (<sup>S382AS468A</sup>Nedd4-2) standen bereits aus früheren Projekten zur Verfügung. Nach erfolgter Mutagenese wurden zum Nachweis der Mutation alle Mutanten sequenziert.

Mutante	Primer
K <sub>V</sub> 1.5ΔN	s: 5´ CTCGGGTTTGCCTTTGGCACCCCTGGCGCAG 3´ as: 5´ CTGCGCCAGGGTGCCAAAGCGCAAACCCGAG 3´
K <sub>V</sub> 1.5ΔC	s: 5´ CTGGACACTAGCCGGTAAAGAGAGATCGAG 3´ as: 5´ CTCGATCTCTCTTTACCGGCTAGTGTCCAG 3´
<sup>T56A</sup> K <sub>V</sub> 1.5	s: 5´ CGAGGAGGCGCGCCGCACACGAGGATGCGGGC 3´ as: 5´ GCCCGCATCCTCGTGTGCGGCGCGCCTCCTCG 3´;
<sup>S81A</sup> K <sub>V</sub> 1.5	s: 5´ CAGCCTAGAAGGCCAGCTGCTGAGGATGAGGAG 3´ as: 5´ CTCCTCATCCTCAGCAGCTGGCCTTCTAGGCTG 3´.
<sup>S535A</sup> K <sub>V</sub> 1.5	s: 5´ CATCCAGAGGCGGGAGGCTGGGCTGGACACAGGAG 3 as: 5´ CTCCTGTGTCCAGCCCAGCCTCCCGCCTCTGGATG 3´
<sup>S569A</sup> K <sub>V</sub> 1.5	s: 5´ CAGTATCAGAAGGGGTGCCTGTCCTCTAGAAAAG 3 as: 5´ CTTTTCTAGAGGACAGGCACCCCTTCTGATACTG 3´

Tabelle 6: Primer für die zielgerichtete Mutagenese

## 2.6 Coimmunopräzipitation

Zum Nachweis der Bindung zwischen K<sub>V</sub>1.5 und den Gerüstproteinen NHERF1/2 wurden Coimmunopräzipitationsexperimente durchgeführt. Dazu wurden Antikörper gegen K<sub>V</sub>1.5 (Tabelle 5) an Protein A/G PLUS-Agarose-Partikel (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) in Oozyten Lyse Puffer (120 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5 % NP-40 ergänzt mit einem Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Mannheim)) über Nacht bei 4 °C gebunden. Die Partikel wurden dann zu dem Lysat der Oozyten hinzugegeben und für zwei h wiederum bei 4 °C inkubiert. Danach wurde drei Mal mit Wasch-Puffer I (100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 500 mM LiCl, 0.5 % NP-40) und zwei Mal mit Wasch-Puffer II (100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.5 % NP-40) gespült. Anschließend wurden die Partikel mit 40 µl SDS-PAGE Puffer in Suspension gebracht und für fünf min auf 95 °C erhitzt. Die Proben wurden dann wie im Kapitel 2.4 „Western-Blot“ beschrieben, weiter verarbeitet.

## 2.7 Nachweis der K<sub>v</sub>1.5 Ubiquitinierung

Die Ubiquitinierung wurde mittels Coimmunopräzipitation ähnlich wie im Kapitel 2.6 „Coimmunopräzipitation“ mit nachfolgendem „Western-Blot“ wie in Kapitel 2.4 „Western-Blot“ beschrieben, durchgeführt. Zudem wurde ein UbiQapture™-Q kit (BIOMOL, Hamburg) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Für die Coimmunopräzipitation wurden anti-K<sub>v</sub>1.5 Antikörper (Tabelle 5) an Protein A/G PLUS-Agarose-Partikel (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) in Oozyten Lyse Puffer (120 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5 % NP-40 ergänzt mit Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Mannheim)) zwei h bei Raumtemperatur gebunden. Die Partikel wurden dann über Nacht bei 4 °C zu isolierten Oozyten Plasmamembranen hinzugegeben. Anschließend wurden die Partikel fünf Mal mit Waschpuffer I (100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 500 mM LiCl, 0.5 % NP-40) und fünf Mal mit Waschpuffer II (100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.5 % NP-40) gespült. Danach wurden die Partikel mit 40 µl SDS-PAGE Probenpuffer in Suspension überführt und bei 100 °C für fünf min erhitzt. Die Proben wurden weiter wie in Kapitel 2.4 „Western-Blot“ verarbeitet.

Um die ubiquitinierten Proteine mittels dem UbiQapture™-Q Kit zu isolieren, wurden über Nacht bei 4 °C 50 µg einer Probe auf die „affinity UbiQapture™-Q matrix“ aufgetragen. Die Matrix wurde dann zwei Mal mit Waschpuffer gewaschen, der zu 9 Teilen aus PBS und zu einem Teil aus Oozyten Lyse Puffer bestand. Die Verbindung aus Ubiquitin und Protein wurden daraufhin durch Zugabe von 80 µl PBS und 25 µl 5x SDS-PAGE Ladepuffer von der Matrix gelöst. Die so erhaltenen Proben wurden durch „Western-Blot“ weiter untersucht.

## 2.8 Nachweis der K<sub>v</sub>1.5 Phosphorylierung

Die Phosphorylierung des K<sub>v</sub>1.5 wurde mittels Coimmunopräzipitation und „Westernblotting“ wie bereits in den Kapiteln 2.4 „Western-Blot“ und 2.6 „Coimmunopräzipitation“ beschrieben, nachgewiesen. Dazu wurde ein Kaninchen anti-phospho (Ser/Thr) Antikörper verwendet.

### 3 Versuche und Ergebnisse

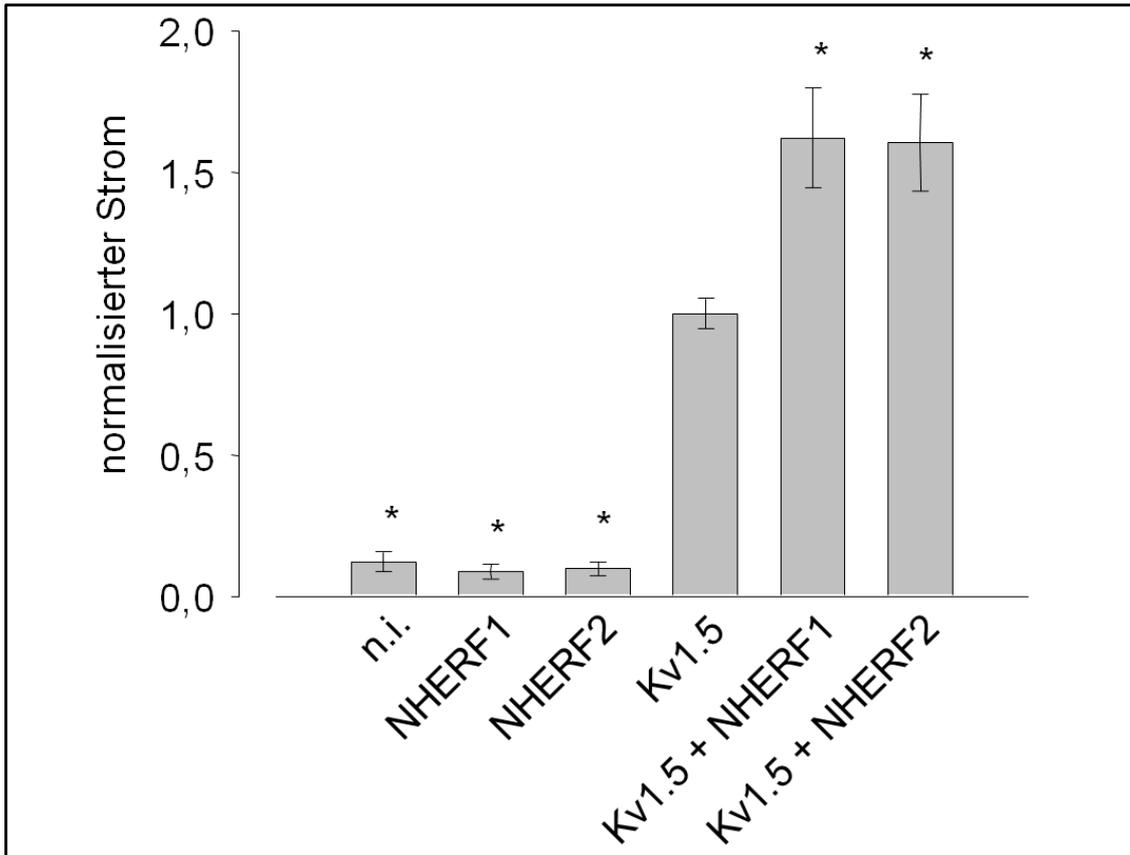
#### 3.1 Molekulare Mechanismen der Stimulation durch NHERF1/2

##### 3.1.1 Stimulation durch NHERF1/2

Zur Überprüfung der Hypothese, dass die Gerüstproteine NHERF1 und NHERF2 den Kaliumkanal  $K_V1.5$  regulieren, wurde der Kanal in *Xenopus laevis* Oozyten mit und ohne Gerüstproteine exprimiert. In der Voltage-Clamp-Messung zeigte sich, dass sich sowohl bei der Koexpression mit NHERF1 als auch mit NHERF2 der messbare Strom erhöht (siehe Tabelle 7 und Abbildung 16). Zur Verdeutlichung sind in Abbildung 17 die Originalspuren der Messung gezeigt.

Injizierte cRNA	% der Kontrolle $\pm$ SEM
$K_V1.5$ + NHERF1	162,2 $\pm$ 17,6
$K_V1.5$ + NHERF2	160,5 $\pm$ 17,0

Tabelle 7: Normalisierter Strom in %  $\pm$  SEM gegenüber der Kontrollgruppe  $K_V1.5$  alleine



**Abbildung 16: Die Gerüstproteine NHERF1 und NHERF2 stimulieren den  $K_{V1.5}$ -Strom in *Xenopus laevis* Oozyten.** Die Oozyten wurden mit Wildtyp  $K_{V1.5}$  alleine oder mit NHERF1 oder NHERF2 zusammen injiziert. Oozyten, die nur mit NHERF1, NHERF2 oder Wasser (n.i.) injiziert waren, dienen als Kontrolle. Vier Tage nach der Injektion wurde mittels der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik der  $K_{V1.5}$  Strom gemessen. Aufgetragen sind das arithmetische Mittel  $\pm$  SEM der  $K_{V1.5}$ -Ströme, in jedem Einzelexperiment wurde auf die Gruppe  $K_{V1.5}$  normalisiert. \* zeigt den statistisch signifikanten Unterschied zu Oozyten, die nur mit  $K_{V1.5}$  cRNA injiziert waren ( $p < 0,05$ );  $n=15$

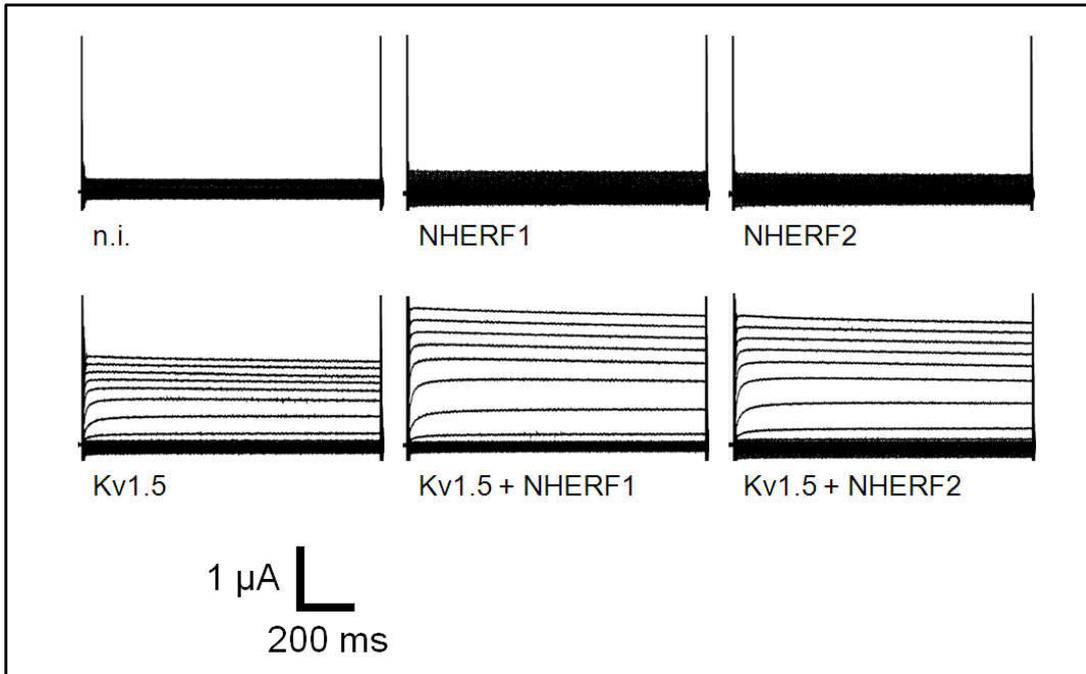


Abbildung 17: Originalspuren aus der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Messung der dargestellten Gruppen

Zusätzlich zur Überprüfung des absoluten Stromes wurde untersucht, ob eine Koinjektion mit NHERF2 die Kinetiken des Ionenkanals  $K_v1.5$  verändert. Dazu wurden die Aktivierungs- und Inaktivierungskinetiken erfasst und in Abbildung 18 dargestellt. Es zeigt sich, dass NHERF2 keinen Effekt auf die Kanalkinetiken hat.

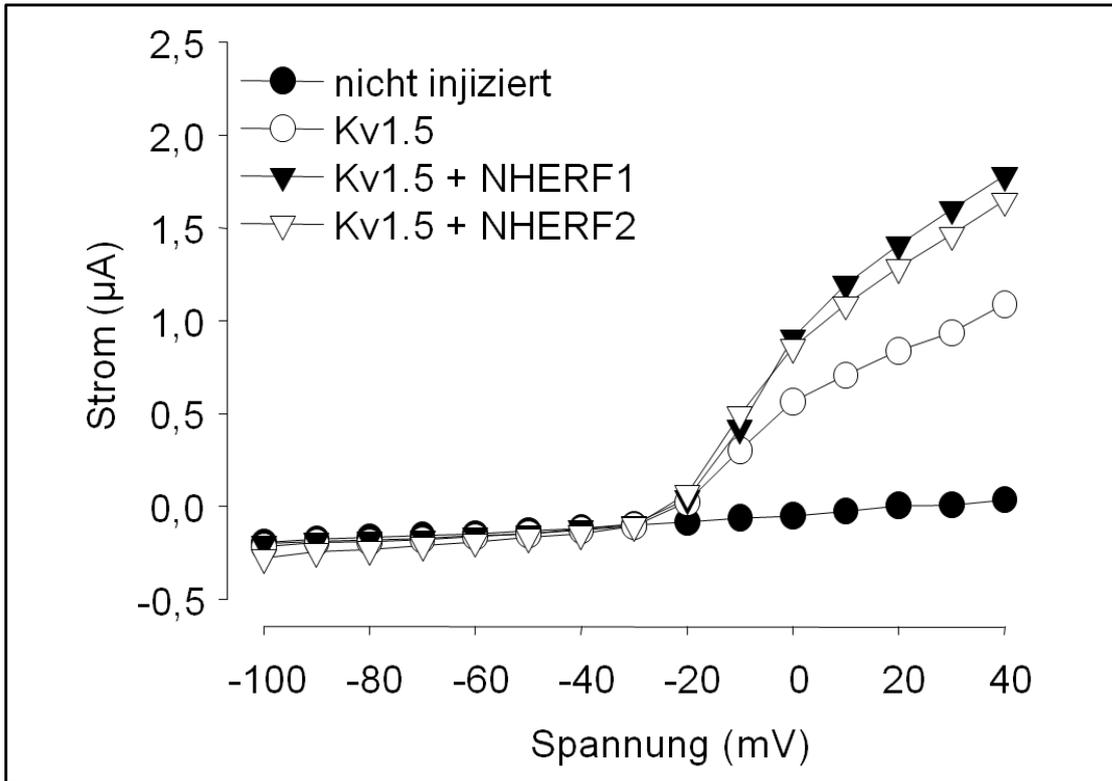
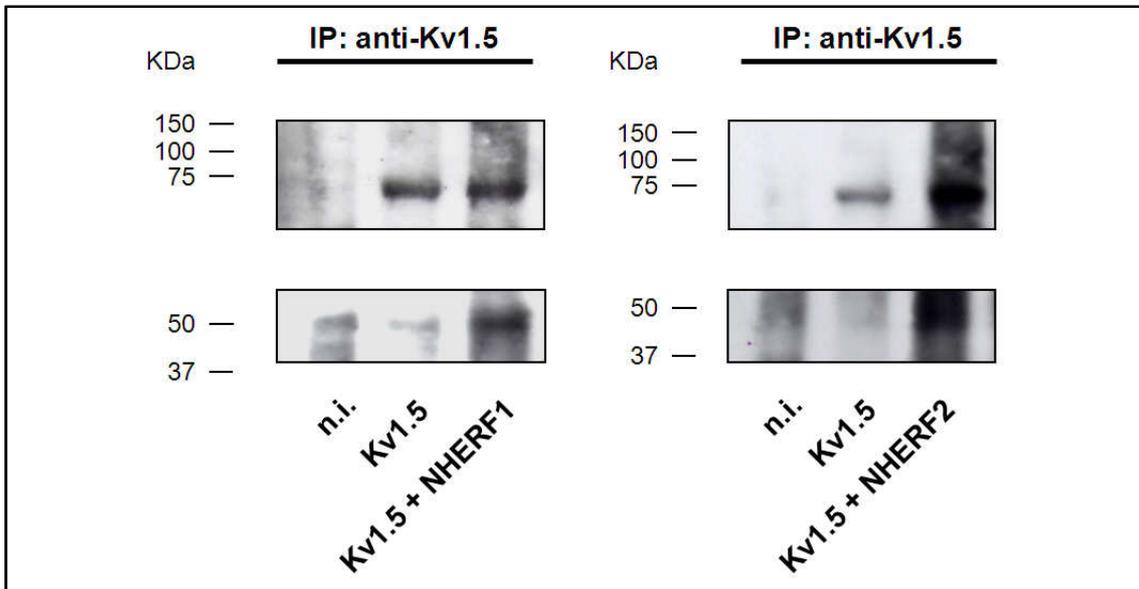


Abbildung 18: Strom-Spannungskurve der dargestellten Gruppen

### 3.1.2 Kv1.5 interagiert direkt mit NHERF2

Die meisten Proteininteraktionen mit PDZ-Domänen spielen sich an den letzten vier Aminosäuren des C-terminalen Endes des interagierenden Proteins ab. Der Kaliumkanal Kv1.5 trägt ein typisches PDZ-Bindemotiv am C-Terminus (E-T-D-L) und ein atypisches PDZ-Bindemotiv im Bereich des N-Terminus. Dieses atypische PDZ-Bindemotiv sitzt am Ende eines Haarnadelmotivs, wodurch ein freies C-terminales Ende, ähnlich dem C-terminalen PDZ-Bindemotiv, simuliert wird. Es sitzt nahe an der „T1 assembly Domäne“, die wichtig für die korrekte Anordnung der Untereinheiten des Kanals ist. Zum Nachweis, dass der Kaliumkanal Kv1.5 und die beiden Gerüstproteine NHERF1 und NHERF2 eine direkte Bindung eingehen, wurden Coimmunopräzipitationsexperimente durchgeführt. Dazu wurden Oozyten mit Kv1.5-cRNA alleine oder mit der cRNA von NHERF1 oder NHERF2 injiziert. Die Abbildung 19 zeigt, dass die Gerüstproteine in den mittels anti-Kv1.5 Antikörper coimmunipräzipitierten

Proben nachgewiesen werden konnten. Damit wurde die direkte Interaktion von  $K_V1.5$  mit NHERF1 und NHERF2 bewiesen.



**Abbildung 19: Die Gerüstproteine NHERF1 und NHERF2 interagieren mit dem  $K_V1.5$  im *Xenopus laevis* Modell.** Oozyten wurden mit Wildtyp  $K_V1.5$  alleine oder zusammen mit NHERF1 oder NHERF2 injiziert. Nach vier Tagen wurde  $K_V1.5$  coimmunopräzipitiert. Mit den Proben wurde anschließend ein Immunoblot mit Antikörpern gegen NHERF1 oder NHERF2 angefertigt.

### 3.1.3 Das C-terminale PDZ-Bindemotiv ist essentiell für die Stimulation durch NHERF2

Um zu klären, welches der beiden PDZ-Bindemotive für die funktionelle Interaktion zwischen  $K_V1.5$  und NHERF2 zuständig ist, wurden Mutanten des Kanals mittels zielgerichteter Mutagenese hergestellt. Zum einen wurde eine Mutante, der das C-terminale PDZ-Bindemotiv fehlt ( $K_V1.5\Delta C$ ) und zum anderen eine Mutante, die nicht mehr über ihr N-terminales Ende verfügt ( $K_V1.5\Delta N$ ), kreiert. Anschließend wurde ihre Aktivität alleine und in Koinjektion mit NHERF2 mittels Voltage-Clamp gemessen (Originalspuren siehe Abbildung 20).

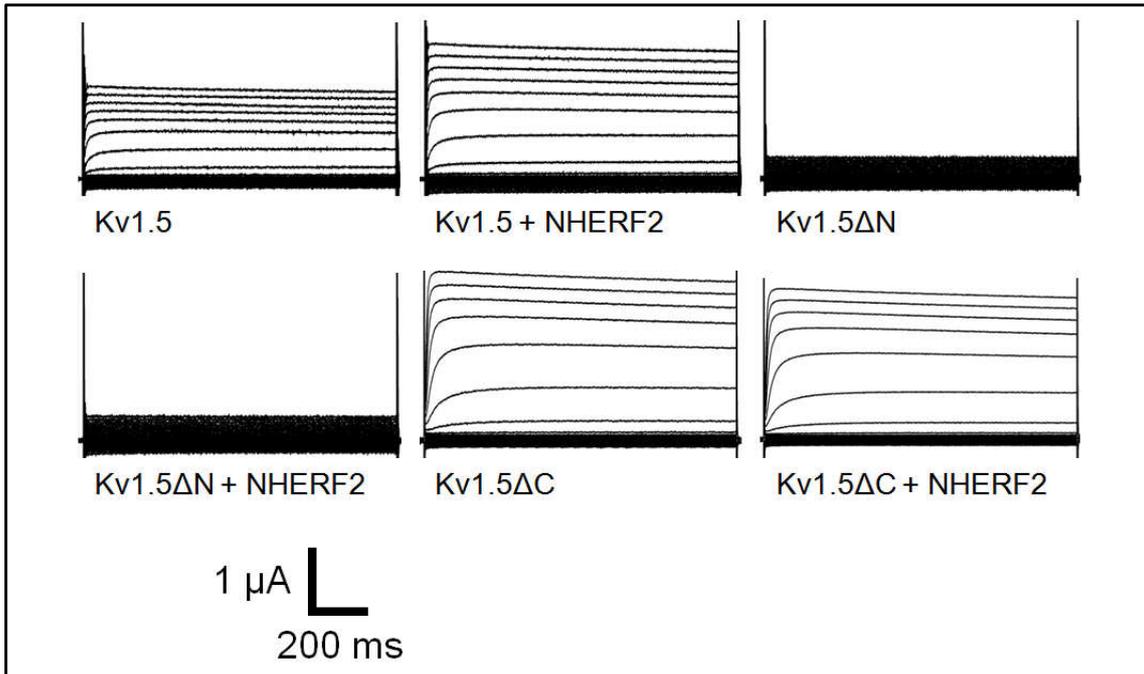
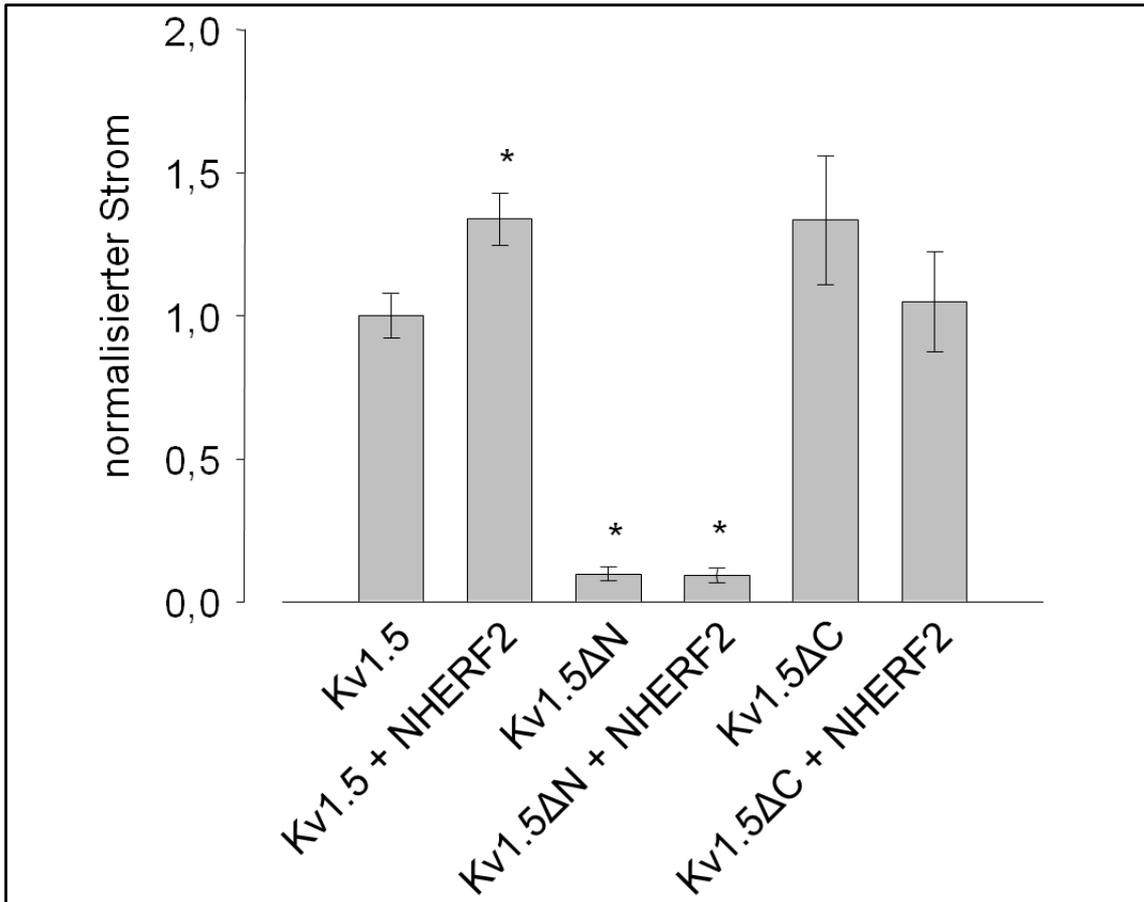


Abbildung 20: Originalspuren aus der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Messung der dargestellten Gruppen



**Abbildung 21: Das C-Terminale PDZ-Bindemotiv wird für die Stimulation des  $K_v1.5$  durch NHERF2 benötigt.** *Xenopus laevis* Oozyten wurden mit Wildtyp  $K_v1.5$ ,  $K_v1.5\Delta N$ ,  $K_v1.5\Delta C$  alleine oder mit NHERF2 zusammen injiziert. Vier Tage nach der Injektion wurden die Ströme elektrophysiologisch erfasst. Aufgetragen sind das arithmetische Mittel  $\pm$  SEM der  $K_v1.5$ -Ströme, in jedem Einzelexperiment wurde dabei auf die Gruppe  $K_v1.5$  normalisiert. \* zeigt den statistisch signifikanten Unterschied zu Oozyten, die nur mit  $K_v1.5$  cRNA injiziert waren ( $p < 0,05$ );  $n=12$

Injizierte cRNA	% der Kontrolle $\pm$ SEM
$K_v1.5 + NHERF2$	$133,9 \pm 8,9$
$K_v1.5\Delta N$	$9,8 \pm 2,4$
$K_v1.5\Delta N + NHERF2$	$9,9 \pm 2,3$
$K_v1.5\Delta C$	$133,3 \pm 22,5$
$K_v1.5\Delta C + NHERF2$	$105,0 \pm 17,3$

**Tabelle 8: Normalisierter Strom in %  $\pm$  SEM gegenüber der Kontrollgruppe  $K_v1.5$  alleine;  $n=12$**

Wie in Abbildung 21 und Tabelle 8 gezeigt, offenbarte die  $K_V1.5\Delta N$ -Mutante jedoch fast keinen messbaren Strom mehr. Im Gegensatz dazu hatte die Mutante ohne C-terminales Ende ( $K_V1.5\Delta C$ ) quantitativ vergleichbare Ströme wie der Wildtyp. NHERF2 war nicht mehr in der Lage die  $K_V1.5\Delta C$ -Ströme zu erhöhen.

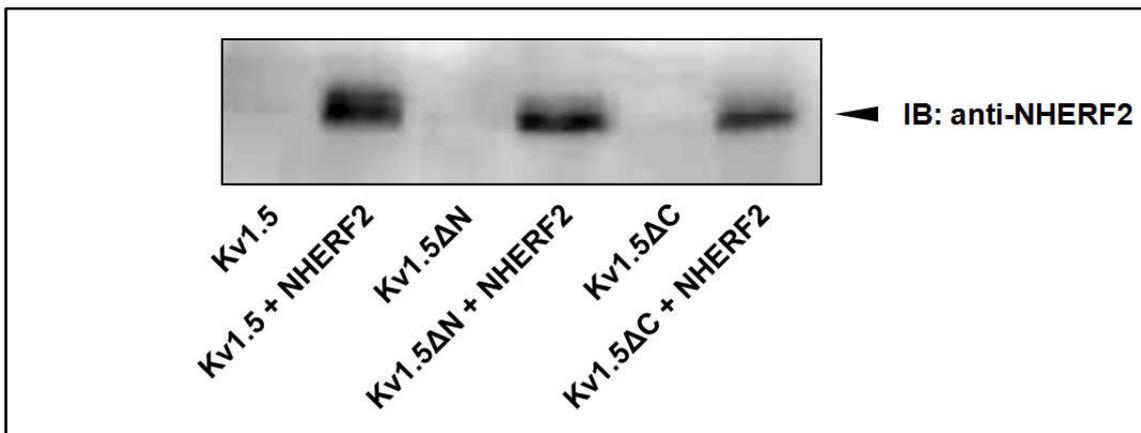


Abbildung 22: Die Expression des NHERF2 wurde mittels „Western-Blot“ aus Lysaten der kompletten Oozyte überprüft.

Um auszuschließen, dass diese Ergebnisse auf einer fehlenden Expression des NHERF2 beruhten, wurden „Western-Blots“ aus den Zelllysaten präpariert (Abbildung 22). Eine fehlerhafte NHERF2 Expression wurde damit ausgeschlossen. So lässt sich aus dieser Beobachtung schlussfolgern, dass das C-terminale PDZ-Bindemotiv maßgeblich an der Regulation des  $K_V1.5$  durch NHERF2 beteiligt ist.

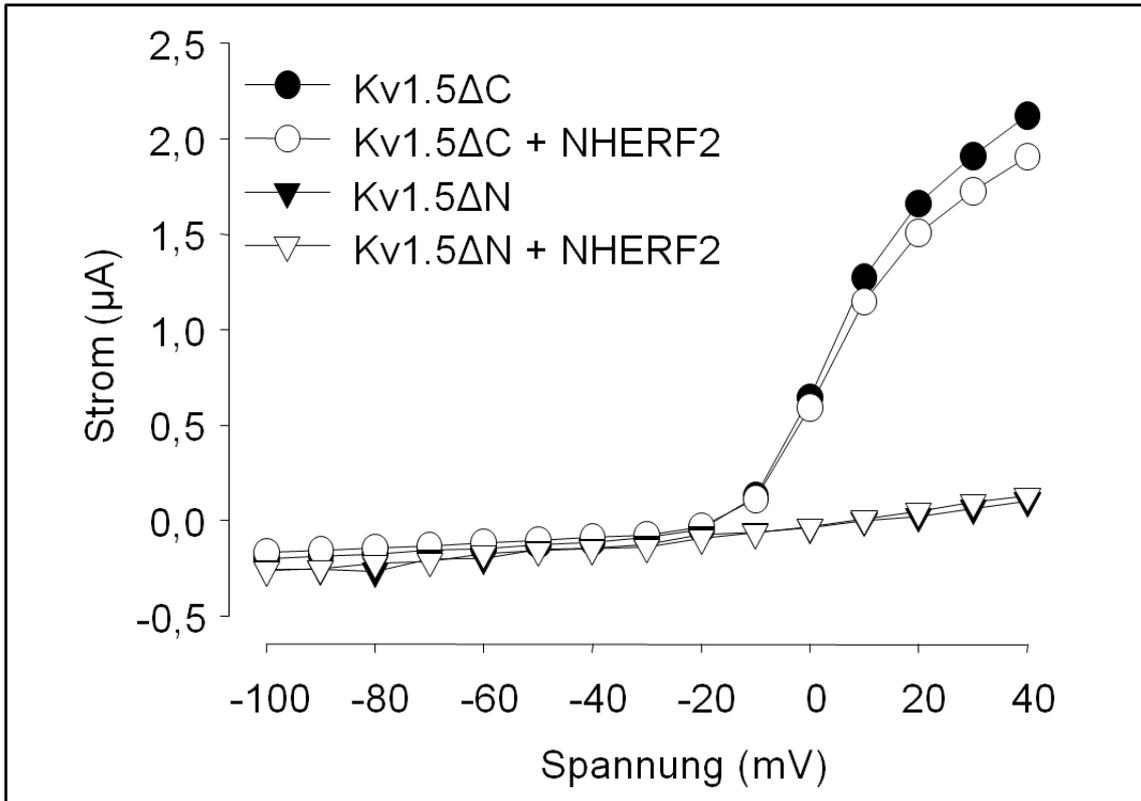
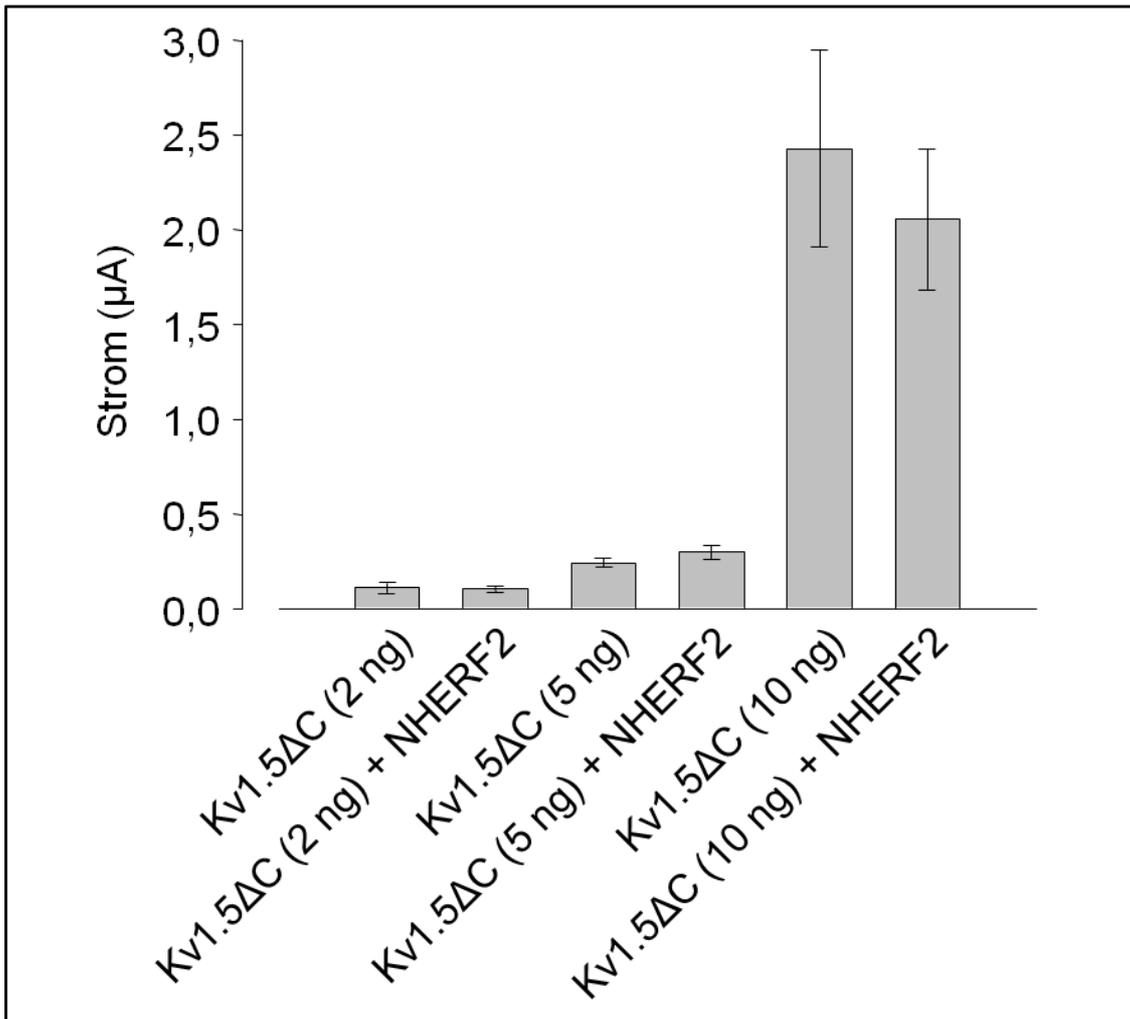


Abbildung 23: Strom-Spannungskurve der dargestellten Gruppen

Um sicherzustellen, dass die  $K_V1.5$ -Mutanten keine veränderten Kinetiken aufwiesen, wurden wiederum die Aktivierungs- und Inaktivierungskinetiken gemessen und in Abbildung 23 dargestellt. Es zeigte sich kein Unterschied im Vergleich zum Wildtyp.

Die leicht geringer ausfallende Zunahme des  $K_V1.5$ -Stromes nach Koinjektion mit NHERF2 bei dieser Serie der Experimente im Vergleich zu den Experimenten, die in Abbildung 16 gezeigt wurden, könnte die variable exogene NHERF2-Expression bei unterschiedlichen Batches widerspiegeln. Die  $K_V1.5\Delta C$ -Mutante zeigte bei gleicher Injektionsmenge der cRNA eine stärkere Aktivität als der Wildtyp. Dieser Umstand könnte auf eine Sättigung der Proteinexpression hindeuten. Wenn das der Fall wäre, hätte man natürlich keine weitere Stimulation durch NHERF2 erwarten können. Um auszuschließen, dass der gemessene hohe Strom einer weiteren Steigerung durch NHERF2 im Wege stand, wurde die  $K_V1.5\Delta C$ -Mutante in

unterschiedlichen Konzentrationen alleine oder zusammen mit NHERF2 injiziert. Die funktionellen Ergebnisse, die aus Abbildung 24 zu entnehmen sind, zeigen, dass NHERF2 keine aktivierende Wirkung auf die  $K_v1.5\Delta C$ -Mutante bei den verschiedenen Konzentrationen hatte.



**Abbildung 24: NHERF2 kann den  $K_v1.5\Delta C$ -Strom auch bei den angegebenen Konzentrationen nicht modulieren.** *Xenopus laevis* Oozyten wurden mit  $K_v1.5\Delta C$  alleine oder mit NHERF2 zusammen in den angegebenen Konzentrationen injiziert. Vier Tage nach der Injektion wurden die Ströme elektrophysiologisch erfasst. Aufgetragen sind der Strom in  $\mu A \pm SEM$  der  $K_v1.5\Delta C$ -Ströme; n=15

### 3.1.4 NHERF2 erhöht die $K_v1.5$ Membranexpression

Zusätzlich zu der Gerüstfunktion von NHERF2, spielt NHERF2 eine Rolle bei der Endo- und Exozytose. Die in Abbildung 25 gezeigten Ergebnisse

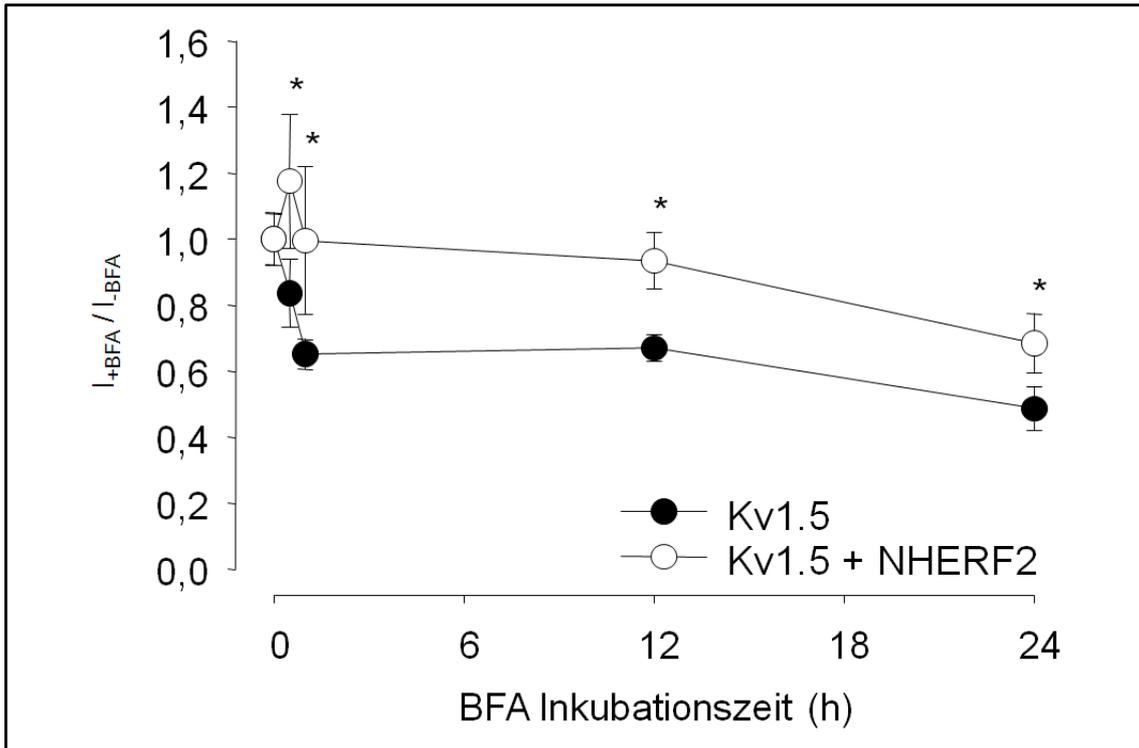
demonstrieren, dass NHERF2 die  $K_v1.5$ -Aktivität dadurch reguliert, indem es die Membranexpression des Kanals erhöht.



**Abbildung 25: NHERF2 erhöht die  $K_v1.5$  Membranexpression.** *Xenopus laevis* Oozyten wurden mit Wildtyp  $K_v1.5$  alleine oder zusammen mit NHERF2 injiziert. Vier Tage nach der Injektion wurde die  $K_v1.5$  Expression mittels „Western-Blot“ aus isolierten Plasmamembranen bestimmt.

### 3.1.5 NHERF2 stabilisiert den $K_v1.5$ in der Plasmamembran

Die erhöhte Membranexpression könnte NHERF2 durch zwei unterschiedliche Mechanismen bewerkstelligen. Zum einen könnte NHERF2 dafür Sorge tragen, dass mehr  $K_v1.5$  in die Membran eingebaut wird, zum anderen aber könnte es auch die Internalisierung des Kanals blockieren. Um festzustellen welcher der beiden Mechanismen vorliegt, wurden Voltage-Clamp Messungen von Oozyten durchgeführt, die  $K_v1.5$  alleine oder zusammen mit NHERF2 exprimierten. Die Zellen wurden zuvor mit Brefeldin A (5  $\mu$ M) inkubiert und zu den in Abbildung 26 angegebenen Zeitpunkten zur Messung entnommen. Brefeldin A blockiert die zellulären Sekretionsmechanismen durch die Inhibition des anterograden Transports vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat. Wenn nun also NHERF2 einen stabilisierenden Effekt auf  $K_v1.5$  hätte, würde die Abnahme des Stromes über die Zeit gesehen in der Kontrollgruppe schneller vonstatten gehen als in der Gruppe, die mit NHERF2 koinjiziert war.



**Abbildung 26: NHERF2 stabilisiert den Kv1.5 in der Plasmamembran.** *Xenopus laevis* Oozyten wurden mit Wildtyp Kv1.5 alleine oder zusammen mit NHERF2 injiziert. Vier Tage nach Injektion wurde mittels Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp die Kv1.5 Aktivität von Oozyten bestimmt, die die angegebene Zeit mit Brefeldin A (5  $\mu$ M) inkubiert worden waren. Gezeigt ist der relative Strom  $\pm$  SEM von inkubierten Oozyten gegenüber Oozyten, die nicht mit Brefeldin A (5  $\mu$ M) inkubiert worden waren. \* zeigt den statistisch signifikanten Unterschied gegenüber Oozyten, die mit Kv1.5 alleine injiziert worden waren ( $p < 0,05$ ).

Die Inkubation der Oozyten mit Brefeldin A (5  $\mu$ M) führte zu der kontinuierlichen Abnahme der Kanalaktivität. Diese Abnahme war allerdings in Zellen, die Kv1.5 alleine exprimierten signifikant schneller als in Zellen, die Kv1.5 und NHERF2 exprimierten (Abbildung 26). Diese Daten legen nahe, dass NHERF2 einen stabilisierenden Effekt auf den Kaliumkanal Kv1.5 hat.

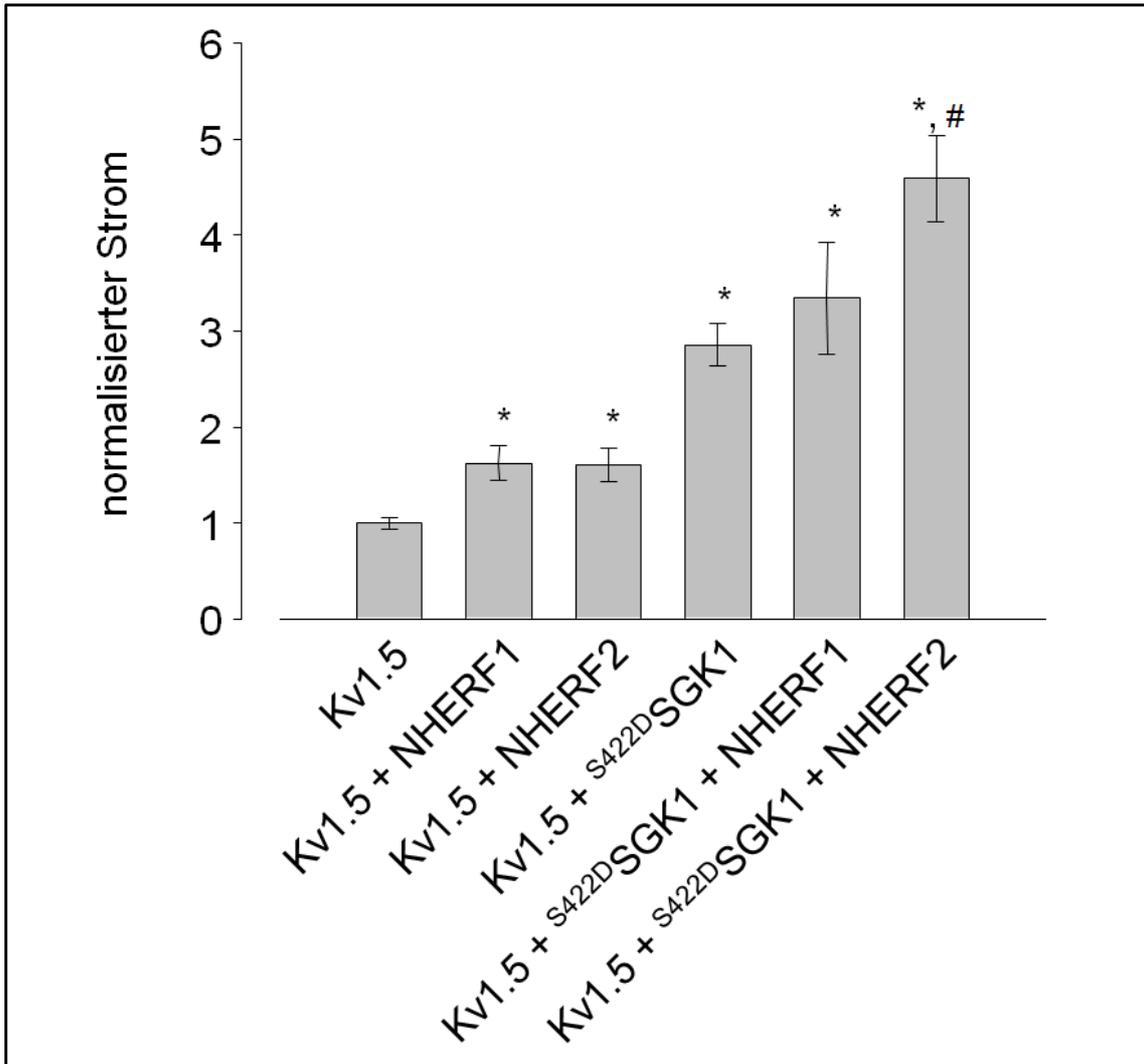
### 3.1.6 Synergistischer Effekt von SGK1 und NHERF2

Aus früheren Untersuchungen war bekannt, dass der Kaliumkanal Kv1.5 durch die Serum- und Glukokortikoid induzierbare Kinase 1 (SGK1) reguliert wird. Zusätzlich wusste man, dass die SGK1 mit NHERF2, aber nicht mit NHERF1 in Interaktion treten kann, und zwar über das C-terminale PDZ-Bindemotiv der

SGK1 und der zweiten PDZ-Domäne des NHERF2. So lag die Vermutung nahe, dass die SGK1 und das Gerüstprotein NHERF2 zusammen synergistisch auf K<sub>V</sub>1.5 einwirken könnten. Um diesen Zusammenhang zu überprüfen, wurde K<sub>V</sub>1.5 in Koinjektion mit SGK1 und NHERF1 oder NHERF2 untersucht. Es wurde eine Mutante der SGK1 benutzt, und zwar die <sup>S442D</sup>SGK1, die eine konstitutiv aktive Mutante darstellt. Wie in Kapitel 1.3 beschrieben, wird diese Mutante direkt nach Expression in ihre volle Aktivität gebracht. Mit Hilfe dieser Mutante wurde vermieden, dass die Kinase in verschiedenen Aktivitätsgraden in der *Xenopus laevis* Oozyte vorlag.

Injizierte cRNA	% der Kontrolle ± SEM
K <sub>V</sub> 1.5 + NHERF1	162,2 ± 17,6
K <sub>V</sub> 1.5 + NHERF2	160,5 ± 17,0
K <sub>V</sub> 1.5 + <sup>S442D</sup> SGK1	285,5 ± 21,8
K <sub>V</sub> 1.5 + <sup>S442D</sup> SGK1 + NHERF1	334,2 ± 57,9
K <sub>V</sub> 1.5 + <sup>S442D</sup> SGK1 + NHERF2	459,1 ± 44,4

**Tabelle 9: Normalisierter Strom in % ± SEM der Kontrollgruppe K<sub>V</sub>1.5 alleine; n=15**



**Abbildung 27: Die SGK1 und NHERF2 wirken synergistisch auf den Kv1.5.** *Xenopus laevis* Oozyten wurden mit Wildtyp Kv1.5 alleine oder zusammen mit <sup>S422D</sup>SGK1, NHERF1, NHERF2 oder in Kombination injiziert. Vier Tage nach der Injektion wurden die Kv1.5-Ströme mittels Voltage-Clamp gemessen. Gezeigt sind das arithmetische Mittel  $\pm$  SEM, in jedem Einzelexperiment wurde dabei auf die Gruppe Kv1.5 normalisiert. \* zeigt den statistische signifikanten Unterscheid gegenüber der Gruppe KV1.5 alleine ( $p < 0,05$ ). # zeigt den statistisch signifikanten Unterschied gegenüber der Gruppe Kv1.5 + <sup>S422D</sup>SGK1 ( $p < 0,05$ );  $n = 15$

Wie in Abbildung 27 zu erkennen, konnte der stimulierende Effekt durch die <sup>S422D</sup>SGK1 mittels der zusätzlichen Injektion mit NHERF2 noch weiter potenziert werden. Die gemeinsame Injektion von <sup>S422D</sup>SGK1 und NHERF1 allerdings brachte im Vergleich zur alleinigen Injektion von <sup>S422D</sup>SGK1 keine signifikante Steigerung des Stromes in der Voltage-Clamp-Messung hervor. Die Originalspuren der Messung sind der Abbildung 28 zu entnehmen.

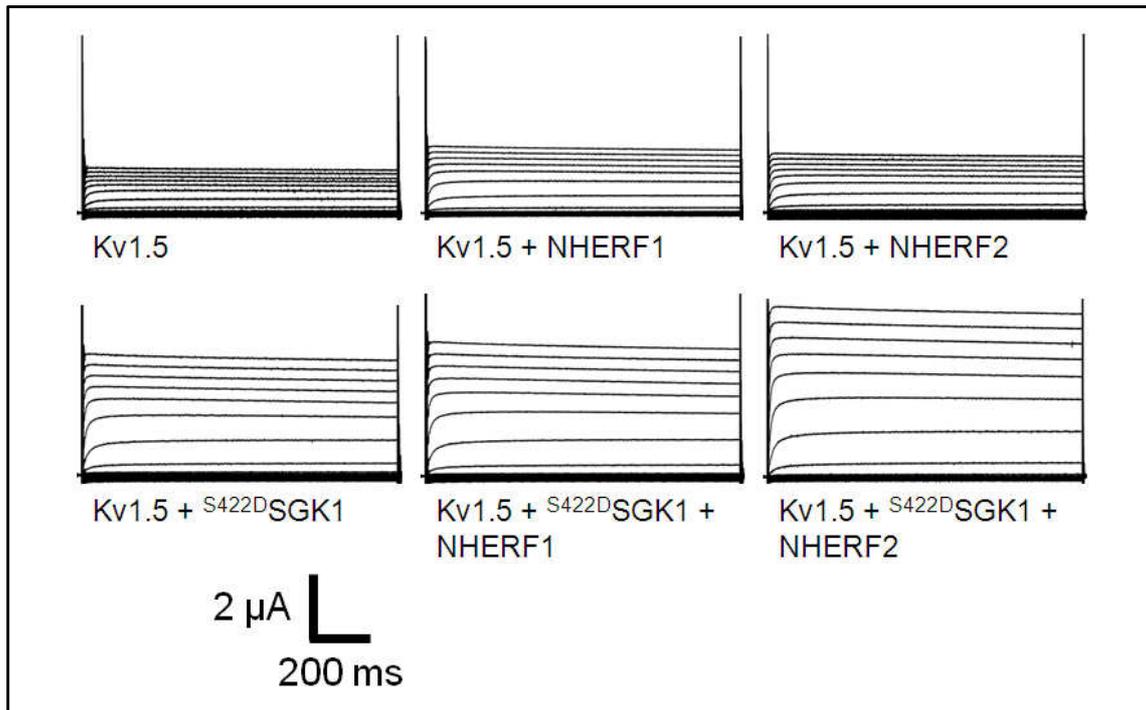


Abbildung 28: Originalspuren aus der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Messung der dargestellten Gruppen

Die oben untersuchten Gruppen wurden auch einer Überprüfung der veränderten Kanalaktivität unterzogen. Die Aktivierungs- und Inaktivierungskinetiken zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen (Abbildung 29).

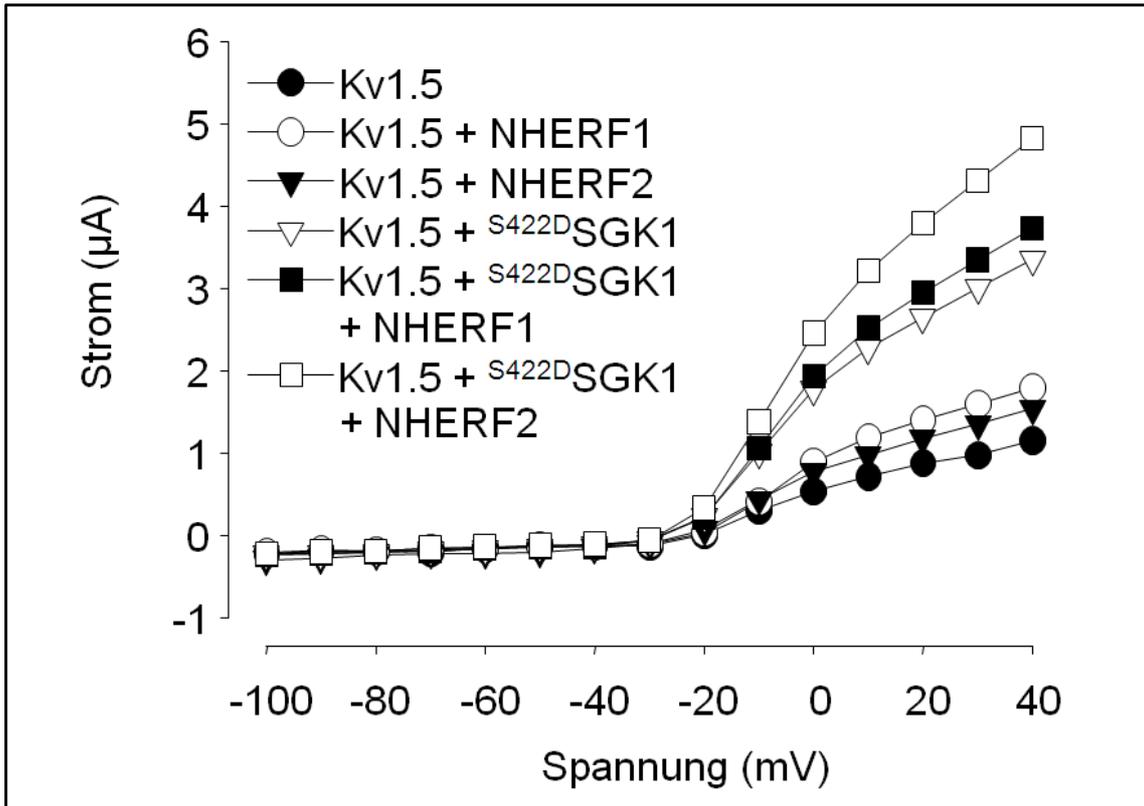


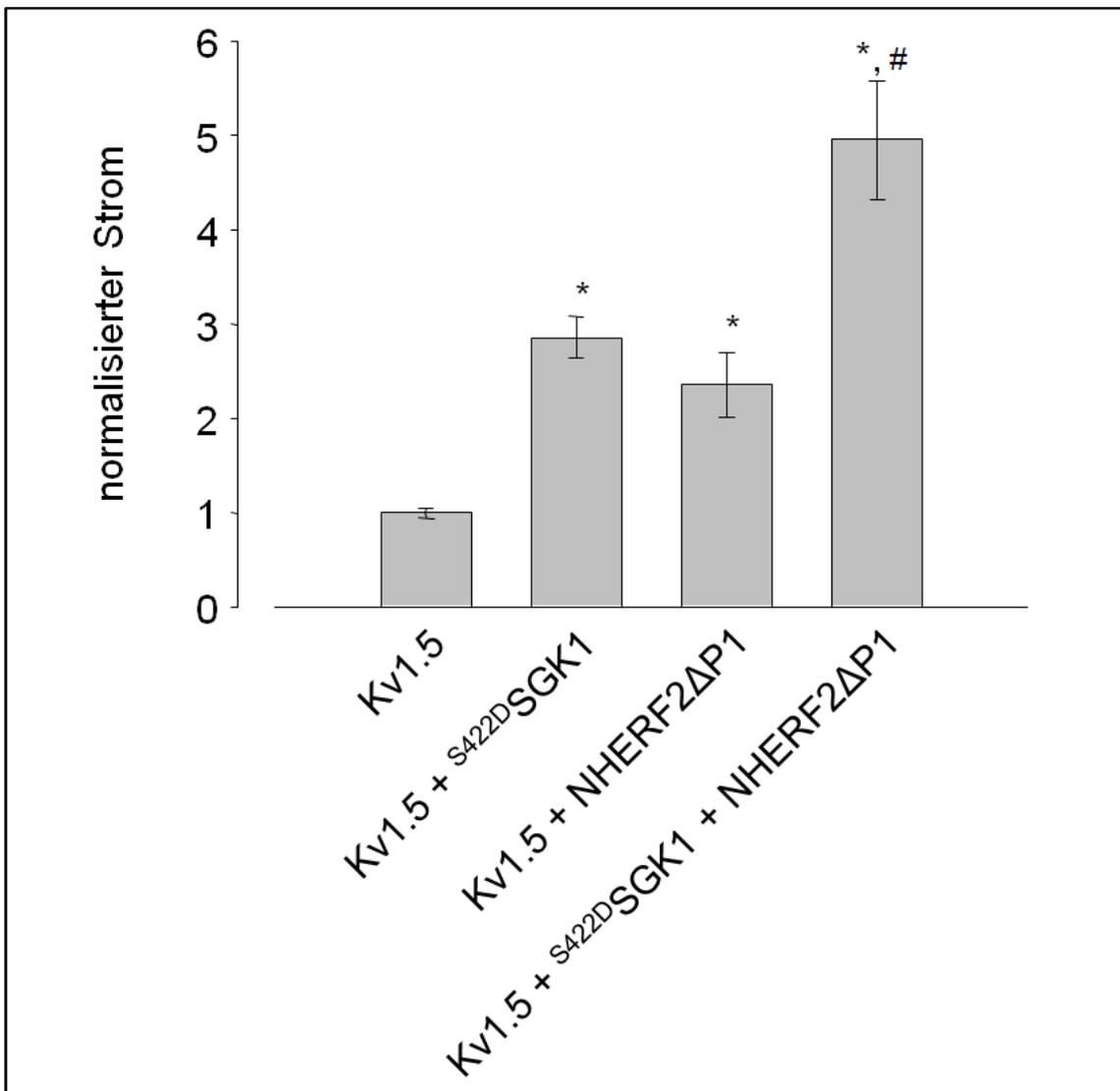
Abbildung 29: Strom-Spannungskurve der dargestellten Gruppen

### 3.1.7 NHERF2 interagiert mit K<sub>V</sub>1.5 über seine zweite PDZ-Domäne

Da NHERF2 über zwei PDZ-Domänen verfügt, sollte die PDZ-Domäne identifiziert werden, die für die Stimulation des K<sub>V</sub>1.5 benötigt wird. Dazu wurden zwei Mutanten benutzt. Die erste Mutante verfügte über keine funktionierende erste PDZ-Domäne (NHERF2ΔP1) und die zweite Mutante nicht über eine funktionierende zweite PDZ-Domäne (NHERF2ΔP2). Zuerst wurde K<sub>V</sub>1.5 in Koexpression mit der SGK1 und der ersten Mutante NHERF2ΔP1 gebracht (siehe Tabelle 10 und Abbildung 30).

Injizierte cRNA	% der Kontrolle $\pm$ SEM
K <sub>V</sub> 1.5 + S <sup>442D</sup> SGK1	285,5 $\pm$ 21,8
K <sub>V</sub> 1.5 + NHERF2 $\Delta$ P1	235,7 $\pm$ 34,0
K <sub>V</sub> 1.5 + S <sup>442D</sup> SGK1 + NHERF2 $\Delta$ P1	495,7 $\pm$ 62,5

Tabelle 10: Normalisierter Strom in %  $\pm$  SEM gegenüber der Kontrollgruppe K<sub>V</sub>1.5 alleine; n=15



**Abbildung 30: NHERF2 $\Delta$ P1 ist in der Lage den stimulativen Effekt der S<sup>422D</sup>SGK1 noch weiter zu steigern.** *Xenopus laevis* Oozyten wurden mit Wildtyp K<sub>V</sub>1.5 alleine oder zusammen mit NHERF2 $\Delta$ P1 und/oder S<sup>422D</sup>SGK1 injiziert. Vier Tage nach der Injektion wurde der K<sub>V</sub>1.5-Strom elektrophysiologisch gemessen. Gezeigt sind das arithmetische Mittel  $\pm$  SEM, in jedem Einzelexperiment wurde dabei auf die Gruppe K<sub>V</sub>1.5 normalisiert. \* zeigt den statistisch signifikanten Unterschied gegenüber der Gruppe K<sub>V</sub>1.5 alleine (p<0,05). # zeigt den statistisch signifikanten Unterschied gegenüber der Gruppe K<sub>V</sub>1.5 + S<sup>422D</sup>SGK1 (p<0,05); n=15

Es zeigte sich, dass eine Koinjektion der Kinase mit NHERF2 $\Delta$ P1 immer noch eine weitere Steigerung des zu messenden Stromes mit sich brachte (siehe Tabelle 10, Abbildung 30 und Originalspuren Abbildung 31).

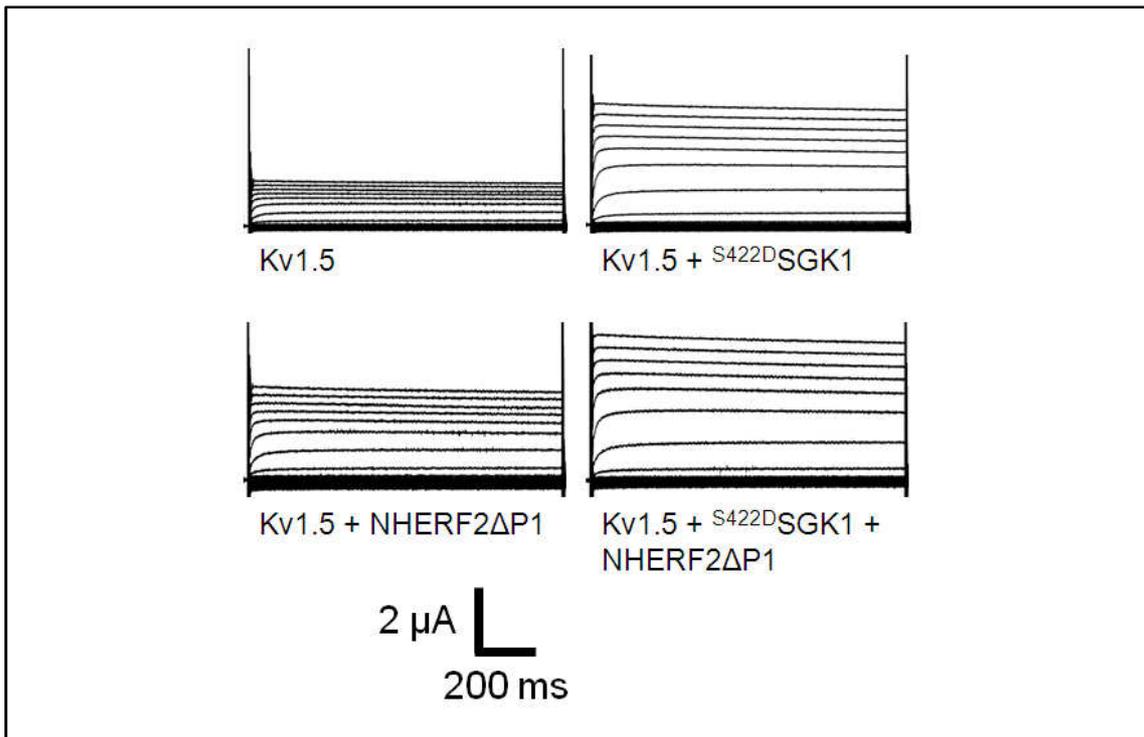


Abbildung 31: Originalspuren aus der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Messung der dargestellten Gruppen

Auch die Aktivierungs- und Inaktivierungskinetiken blieben unverändert (siehe Abbildung 32).

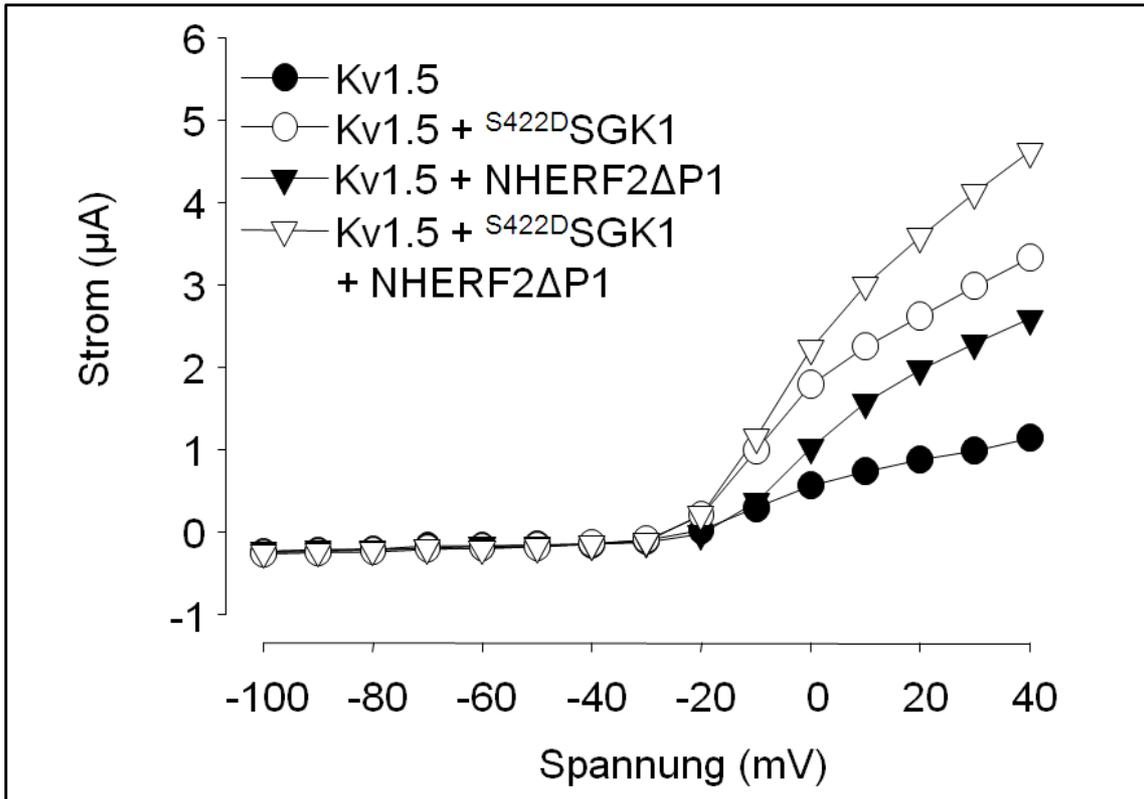
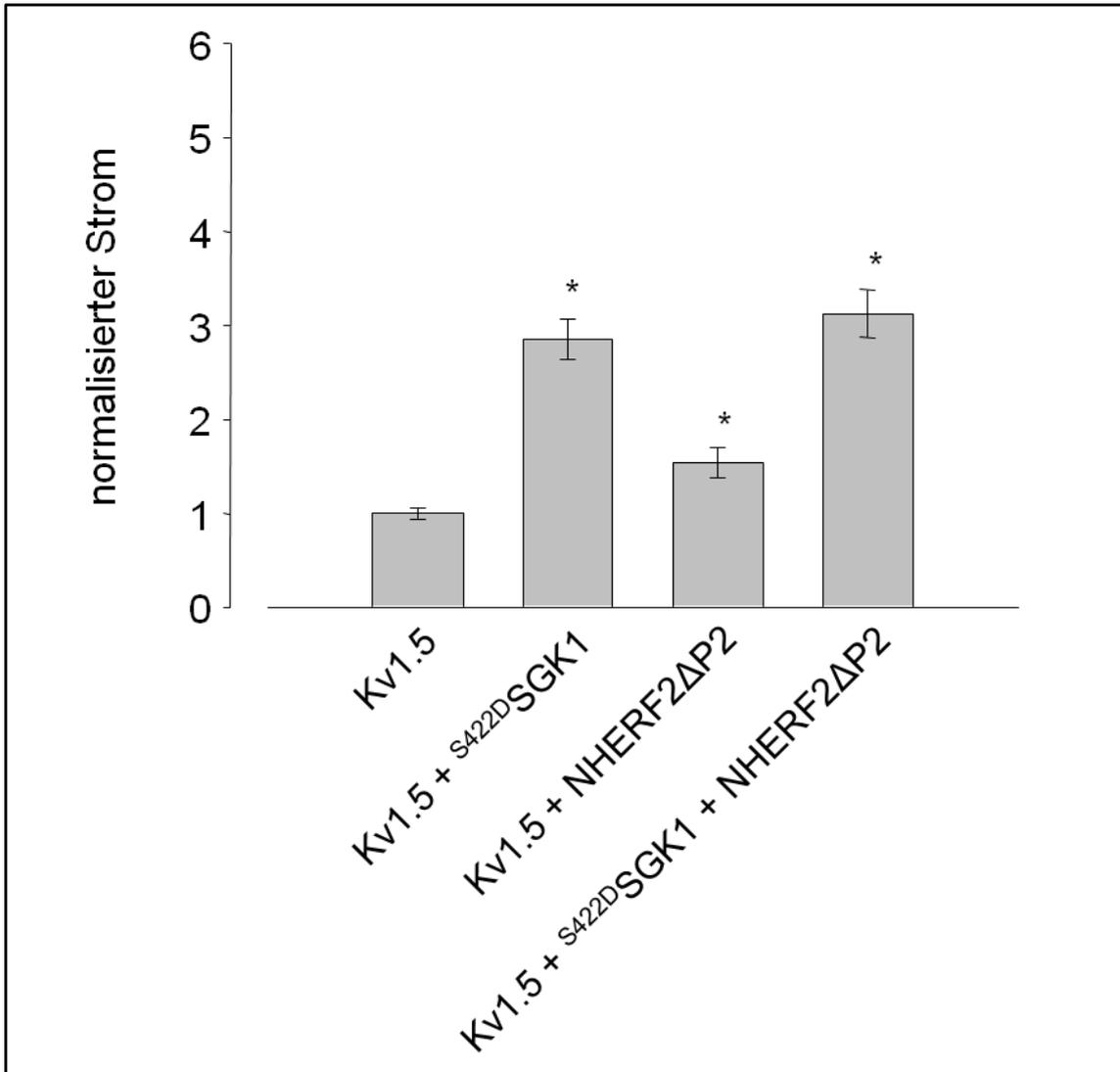


Abbildung 32: Strom-Spannungskurve der dargestellten Gruppen

Im nächsten Schritt wurde die zweite Mutante NHERF2ΔP2 zur Koinjektion gebracht. Im Gegensatz zur ersten Mutante konnte NHERF2ΔP2 den stimulativen Effekt der SGK1 nicht weiter verstärken (siehe Abbildung 33 und Originalspuren in Abbildung 34). Der gemessene Strom in der Gruppe, die mit SGK1 und NHERF2ΔP2 koinjiziert war, unterschied sich nicht signifikant von der Gruppe, die mit SGK1 alleine injiziert wurde. So spielt die zweite PDZ-Domäne eine entscheidende Rolle bei der Interaktion zwischen der Kinase SGK1 und dem Gerüstprotein NHERF2.



**Abbildung 33: NHERF2ΔP2 kann den stimulativen Effekt der <sup>S422D</sup>SGK1 nicht weiter verstärken.** *Xenopus laevis* Oozyten wurden mit Wildtyp Kv1.5 alleine oder zusammen mit NHERF2ΔP2 und/oder <sup>S422D</sup>SGK1 injiziert. Vier Tage nach der Injektion wurde der Kv1.5-Strom elektrophysiologisch gemessen. Gezeigt sind das arithmetische Mittel ± SEM, in jedem Einzelexperiment wurde dabei auf die Gruppe Kv1.5 normalisiert. \* zeigt den statistisch signifikanten Unterschied gegenüber der Gruppe Kv1.5 alleine (p<0,05); n=15

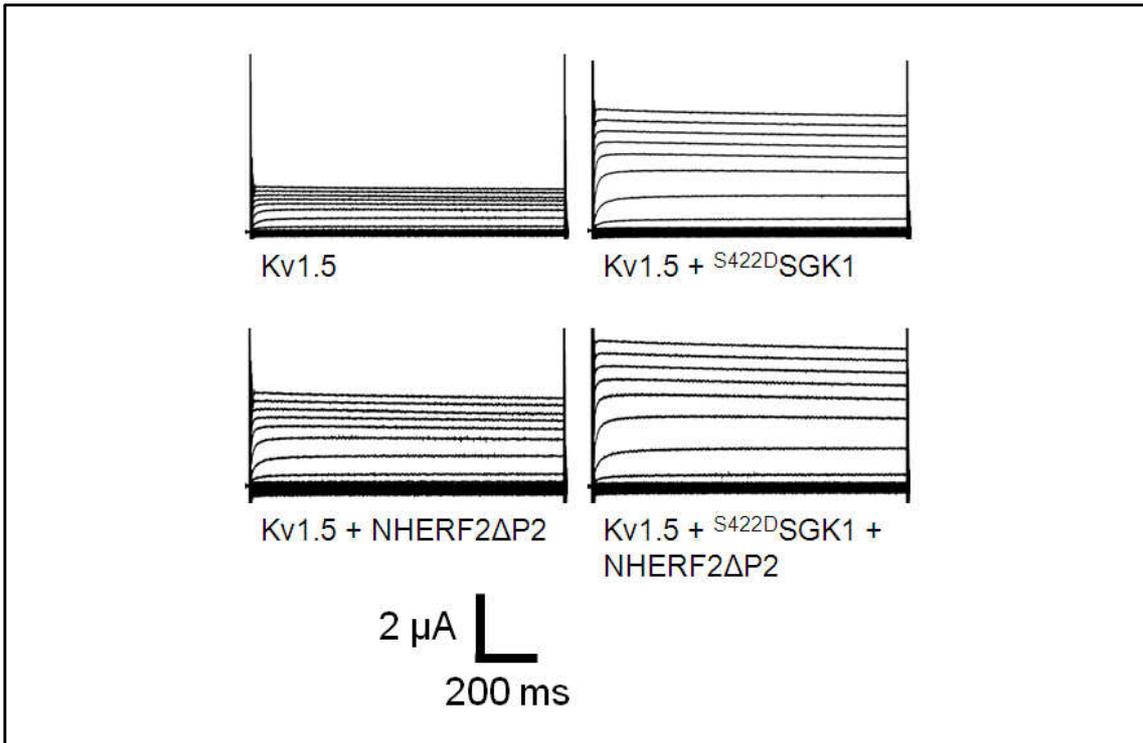


Abbildung 34: Originalspuren aus der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Messung der dargestellten Gruppen

Die Messung der Aktivierungs- und Inaktivierungskinetiken erbrachte keine unterschiedlichen Ergebnisse im Vergleich zwischen den verschiedenen Gruppen (siehe Abbildung 35).

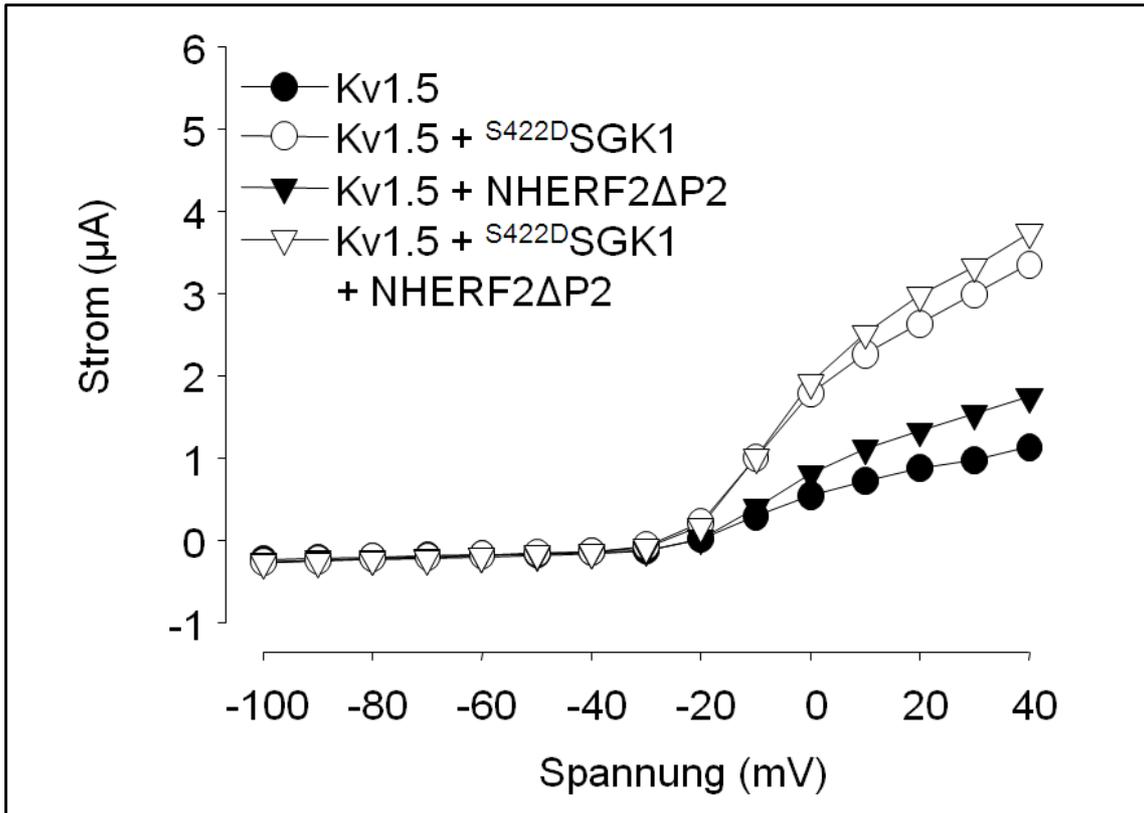


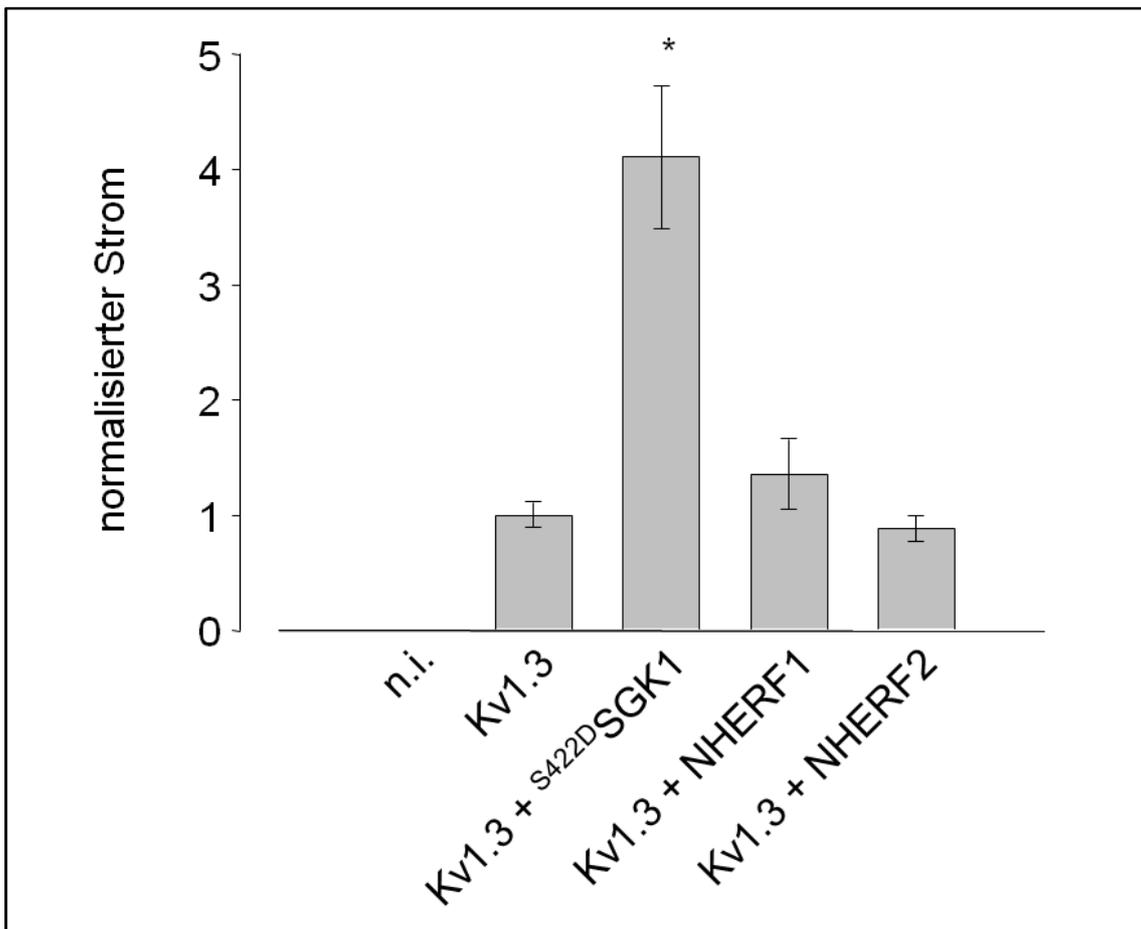
Abbildung 35: Strom-Spannungskurve der dargestellten Gruppen

### 3.1.8 Effekte des NHERF sind spezifisch für Kv1.5

Es gibt einige Kaliumkanäle der  $K_V$ -Familie, die über ein PDZ-Bindemotiv verfügen, das möglicherweise auch von Proteinen erkannt wird, die ihrerseits eine PDZ-Domäne tragen. Ein Vertreter der  $K_V$ -Familien, der auch ein PDZ-Bindemotiv trägt, ist der spannungsabhängige Kaliumkanal  $K_V1.3$ . In vorangegangenen Studien wurde bereits gezeigt, dass der  $K_V1.3$  zudem durch die SGK1 stimuliert wird. Es liegt also der Schluss nahe, dass NHERF1 oder auch NHERF2 den Kaliumkanal  $K_V1.3$  ebenfalls beeinflussen könnten. Um diese Theorie zu überprüfen, wurde  $K_V1.3$  in Koexpression mit der Kinase SGK1 oder NHERF1/2 gebracht und anschließend mittels Voltage-Clamp elektrophysiologisch gemessen.

Injizierte cRNA	% der Kontrolle $\pm$ SEM
K <sub>V</sub> 1.3 + S <sup>442D</sup> SGK1	410,8 $\pm$ 61,9
K <sub>V</sub> 1.3 + NHERF1	135,0 $\pm$ 30,1
K <sub>V</sub> 1.3 + NHERF2	88,6 $\pm$ 11,1

Tabelle 11: Normalisierter Strom in %  $\pm$  SEM gegenüber der Kontrollgruppe K<sub>V</sub>1.3 alleine; n=23



**Abbildung 36: Weder NHERF1 noch NHERF2 stimuliert den K<sub>V</sub>1.3.** *Xenopus laevis* Oozyten wurden mit Wildtyp K<sub>V</sub>1.3 alleine oder zusammen mit S<sup>422D</sup>SGK1, NHERF1 oder NHERF2 injiziert. Vier Tage nach der Injektion wurde per Voltage-Clamp der K<sub>V</sub>1.3-Strom ermittelt. Gezeigt sind das arithmetische Mittel  $\pm$  SEM, in jedem Einzelexperiment wurde dabei auf die Gruppe K<sub>V</sub>1.3 normalisiert. \* zeigt den statistisch signifikanten Unterschied gegenüber Gruppe K<sub>V</sub>1.3 alleine ( $p < 0,05$ ); n=45

Entgegen der Hypothese zeigte sich, dass weder NHERF1 noch NHERF2 in der Lage waren die Aktivität des K<sub>V</sub>1.3 signifikant zu erhöhen (siehe Tabelle 11 und Abbildung 36). Der bereits bekannte stimulative Effekt der SGK1 auf den

Kaliumkanal konnte reproduziert werden. Um eine fehlende Proteinexpression der NHERF-Proteine auszuschließen, wurden „Western-Blots“ angefertigt (siehe Abbildung 37).

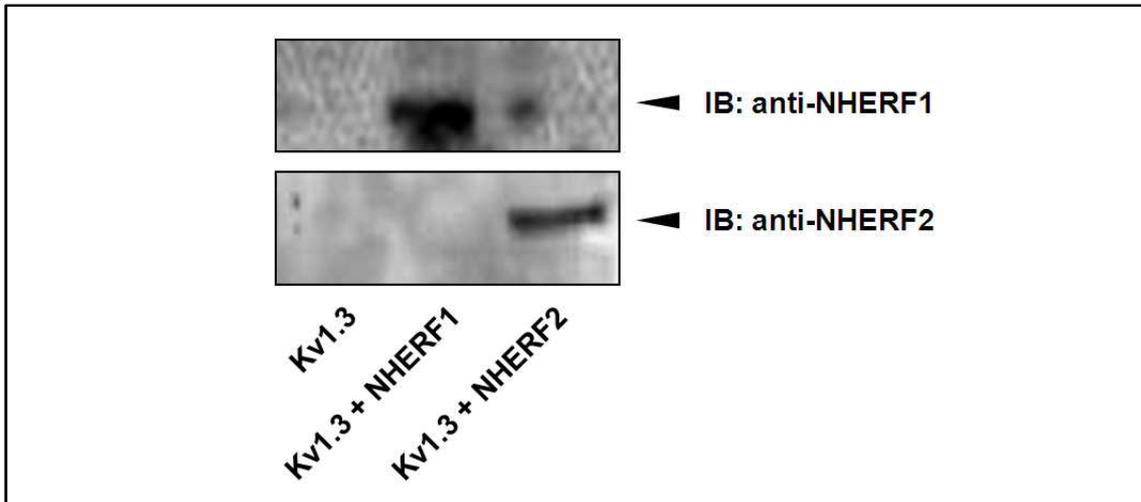


Abbildung 37: Die Expression der NHERF-Isoformen wurde mittels „Western-Blot“ aus den Zelllysaten überprüft.

Der ausbleibende Effekt der NHERF-Proteine auf den  $K_V1.3$  lässt auf einen spezifischen Effekt der NHERFs auf den Kaliumkanal  $K_V1.5$  schließen.

## 3.2 Molekulare Mechanismen der Stimulation durch SGK1

### 3.2.1 SGK1 Phosphorylierungsstellen

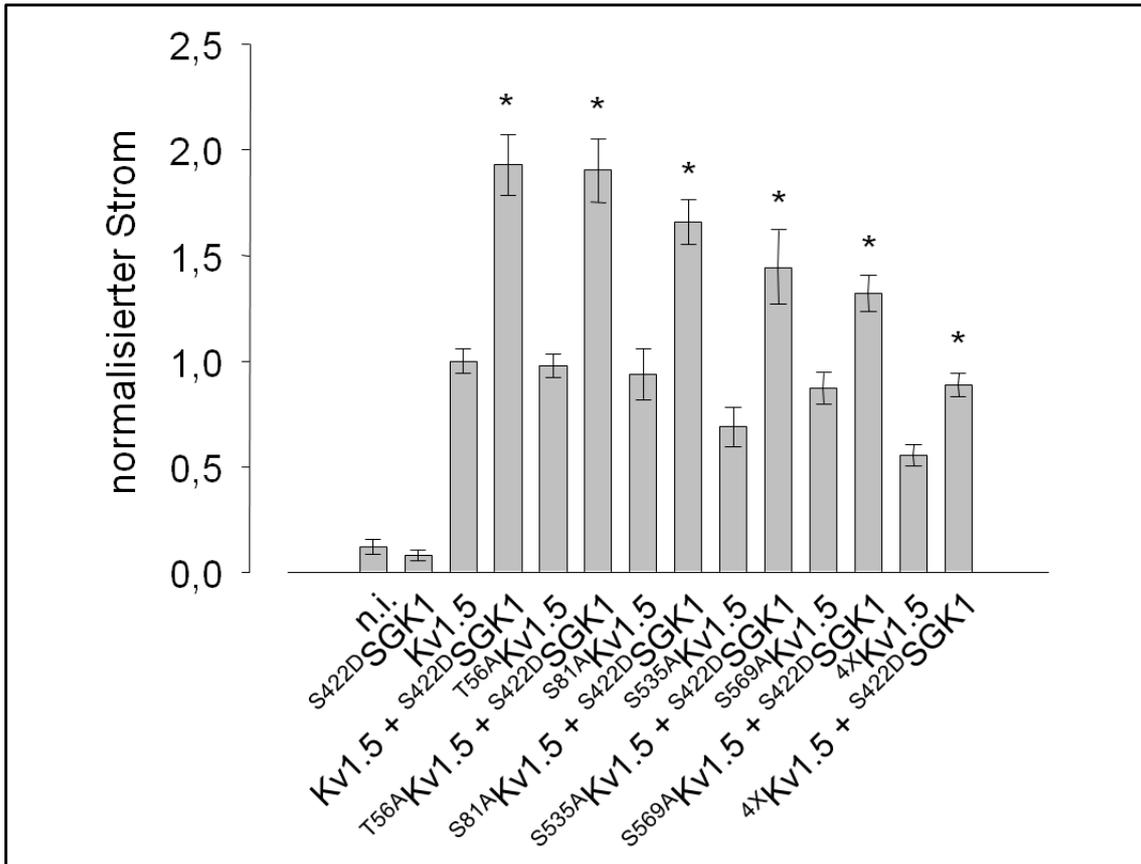
Wie bereits in Abbildung 27 gezeigt, wird der Kaliumkanal  $K_V1.5$  durch die Serum- und Glukokortikoid-induzierbare Kinase (SGK1) stimuliert. Der molekulare Mechanismus der Stimulation verblieb jedoch bisher unbekannt.

$K_V1.5$  verfügt über vier mögliche SGK1-Phosphorylierungsstellen, und zwar an Position  $^{56}\text{Thr}$ ,  $^{81}\text{Ser}$ ,  $^{535}\text{Ser}$  und bei Position  $^{569}\text{Ser}$ . Dabei befinden sich die Positionen  $^{56}\text{Thr}$  und  $^{81}\text{Ser}$  in der Nähe des N-terminalen Endes und die Positionen  $^{535}\text{Ser}$  und  $^{569}\text{Ser}$  am C-terminalen Ende. Von allen Stellen ist die

Position <sup>569</sup>Ser in den meisten Spezies, unter anderem im Menschen, in der Maus, in der Ratte und im Hasen am besten konserviert. Die anderen drei Stellen zeichnen sich nicht in diesem Maße aus. Um zu klären, ob die SGK1 den Kaliumkanal K<sub>V</sub>1.5 direkt durch Phosphorylierung stimuliert, wurden Mutanten des Kanals hergestellt, die entweder jede einzelne Position zu Alanin oder gleich alle vier Positionen zu Alanin mutiert hatten (<sup>T56A</sup>K<sub>V</sub>1.5, <sup>S81A</sup>K<sub>V</sub>1.5, <sup>S535A</sup>K<sub>V</sub>1.5, <sup>S569A</sup>K<sub>V</sub>1.5, K<sub>V</sub>1.5 4x Mutante (<sup>T56AS81AS535AS569A</sup>K<sub>V</sub>1.5)). Diese Mutanten wurden dann in Form von cRNA mit und ohne SGK1 in *Xenopus laevis* Oozyten injiziert und mittels Voltage-Clamp gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 38 und Tabelle 12 dargestellt.

Injizierte cRNA	% der Kontrolle ± SEM
<sup>T56A</sup> K <sub>V</sub> 1.5 + <sup>S442D</sup> SGK1	190,3 ± 15,1
<sup>S81A</sup> K <sub>V</sub> 1.5 + <sup>S442D</sup> SGK1	165,7 ± 10,5
<sup>S535A</sup> K <sub>V</sub> 1.5 + <sup>S442D</sup> SGK1	144,3 ± 17,3
<sup>S569A</sup> K <sub>V</sub> 1.5 + <sup>S442D</sup> SGK1	132,0 ± 08,6
<sup>4X</sup> K <sub>V</sub> 1.5 + <sup>S442D</sup> SGK1	88,8 ± 05,6

**Tabelle 12: Normalisierter Strom in % ± SEM gegenüber der Kontrollgruppe K<sub>V</sub>1.5 alleine; n=8, 7, 7, 19, 21**



**Abbildung 38:**  $Kv_{1.5}$  wird durch die  $S^{422D}$ SGK1 stimuliert. Die Mutation der möglichen Phosphorylierungsstellen führt nicht zum Aufheben des Effektes. *Xenopus laevis* Oozyten wurden mit dem Wildtyp oder den Mutanten des  $Kv_{1.5}$  alleine oder zusammen mit der  $S^{422D}$ SGK1 injiziert. Vier Tage nach der Injektion wurde der  $Kv_{1.5}$ -Strom mittels Voltage-Clamp bestimmt. Gezeigt sind das arithmetische Mittel  $\pm$  SEM, in jedem Einzelexperiment wurde dabei auf die Gruppe  $Kv_{1.5}$  normalisiert. \* zeigt den statistisch signifikanten Unterschied gegenüber der Gruppe, die nur den Kanal alleine exprimiert ( $p < 0,05$ ); n: siehe Tabelle 12

Wie aus Tabelle 12 und Abbildung 38 ersichtlich, führte eine Mutation der mutmaßlichen Phosphorylierungsstellen für die SGK1 nicht zu einem Verlust der Stimulation durch die SGK1, auch nicht, wenn wie bei der 4x Mutante alle möglichen Phosphorylierungsstellen ausgeschaltet wurden. Die Phosphorylierung spielte also keine Rolle für die Stimulation durch die SGK1.

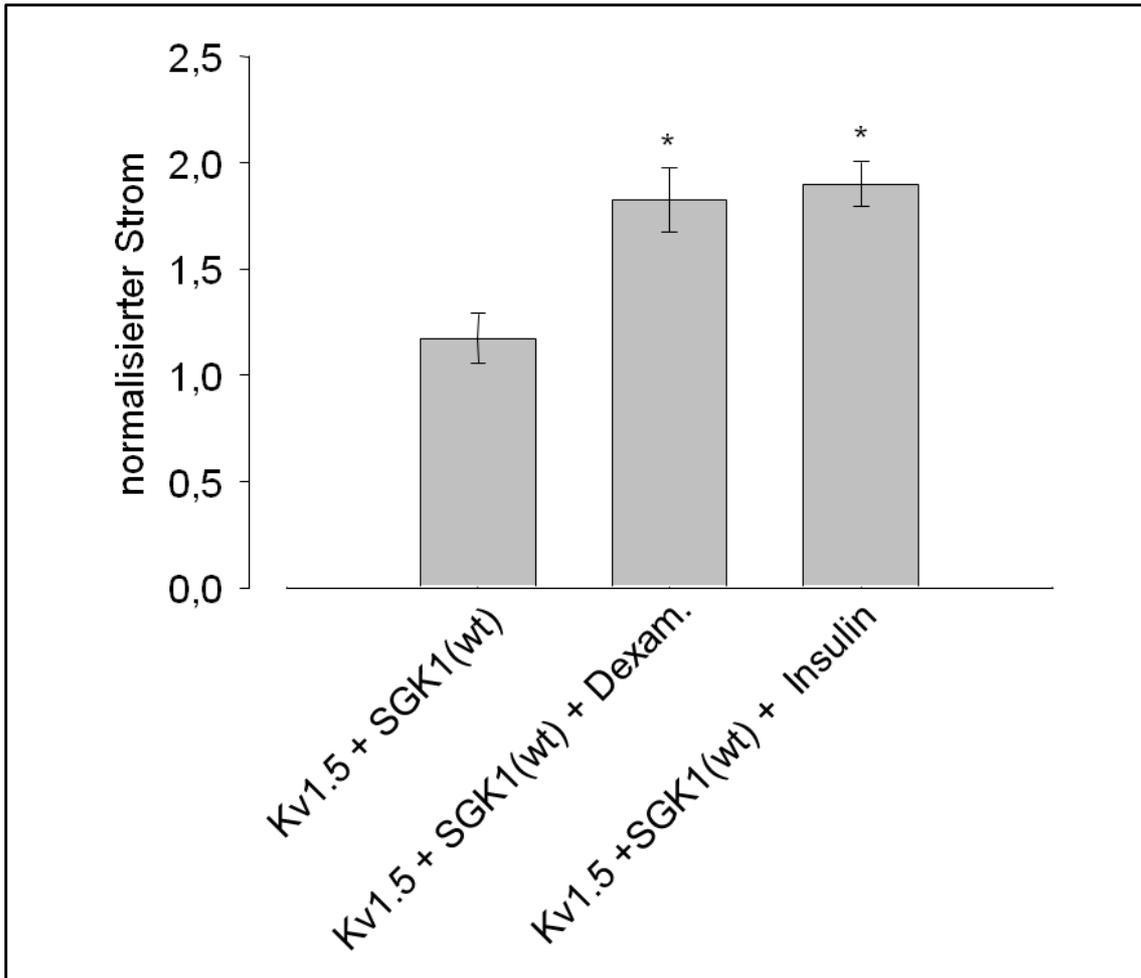
### 3.2.2 Dexamethason und Insulin verstärken die Aktivierung der SGK1

In einer weiteren Serie von Experimenten wurde versucht die SGK1 auf transkriptioneller und translatorischer Ebene durch Zugabe von Dexamethason

und Insulin zu aktivieren. Die mit dem Wildtyp der SGK1 injizierten Oozyten wurden 24 h vor der Messung entweder mit Insulin (1  $\mu$ M) oder mit Dexamethason (1  $\mu$ M) inkubiert. Wie in Tabelle 13 und Abbildung 39 zu sehen, führte die Inkubation zu einer Verstärkung der Stimulation durch den Wildtyp der SGK1 auf ein Level, das mit der Stimulation durch die konstitutiv aktive Mutante <sup>S442D</sup>SGK1 auch erreicht wurde.

Injizierte cRNA	% der Kontrolle $\pm$ SEM
K <sub>V</sub> 1.5 + SGK (wt) (1 $\mu$ M Dexamethason)	155,5 $\pm$ 6,2
K <sub>V</sub> 1.5 + SGK (wt) (1 $\mu$ M Insulin)	161,7 $\pm$ 8,8

**Tabelle 13: Normalisierter Strom in %  $\pm$  SEM gegenüber der Kontrollgruppe K<sub>V</sub>1.5 + SGK1 (wt); n=10**

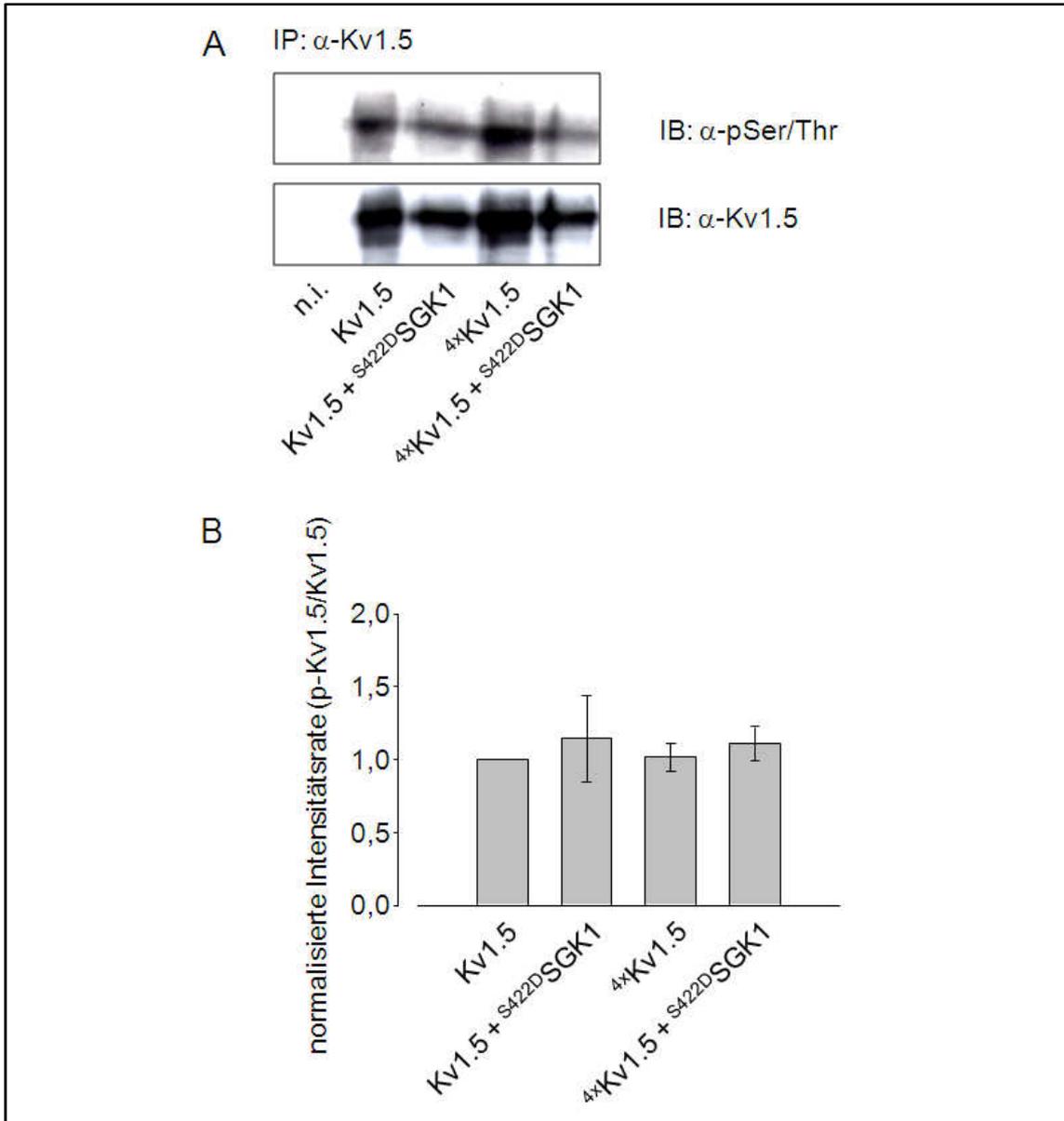


**Abbildung 39: Dexamethason und Insulin erhöhen den stimulativen Effekt auf  $K_V1.5$  durch die SGK1.** *Xenopus laevis* Oozyten wurden mit Wildtyp  $K_V1.5$  und Wildtyp SGK1 injiziert und die entsprechenden Gruppen 24 h vor der Messung in Dexamethason ( $1 \mu\text{M}$ ) oder Insulin ( $1 \mu\text{M}$ ) inkubiert. Vier Tage nach der Injektion wurden die  $K_V1.5$ -Ströme mittels Voltage-Clamp bestimmt. Gezeigt ist das arithmetische Mittel  $\pm$  SEM, in jedem Einzelexperiment wurde dabei auf die Gruppe  $K_V1.5 + \text{SGK1(wt)}$  normalisiert. \* zeigt den statistisch signifikanten Unterschied zu Oozyten, die nicht mit Dexamethason oder Insulin inkubiert wurden ( $p < 0,05$ );  $n=10$

### 3.2.3 Die SGK1 wirkt nicht über Phosphorylierung auf den $K_V1.5$

Wie in Kapitel 3.2.1 „SGK1 Phosphorylierungsstellen“ gezeigt, war der stimulative Effekt auf den Kaliumkanal  $K_V1.5$  unabhängig von dessen Phosphorylierung. Mittels Coimmunopräzipitation und Westernblotting wurde nachgewiesen, dass das Ausmaß der Phosphorylierung in Zellen, die mit  $K_V1.5$  alleine und solche, die mit  $K_V1.5$  und SGK1 injiziert wurden, nicht signifikant unterschiedlich war (siehe Abbildung 40). Auch die 4x Mutante, die über keine

möglichen Phosphorylierungsstellen für die SGK1 mehr verfügte, zeigte keine geringere Rate an Phosphorylierung.



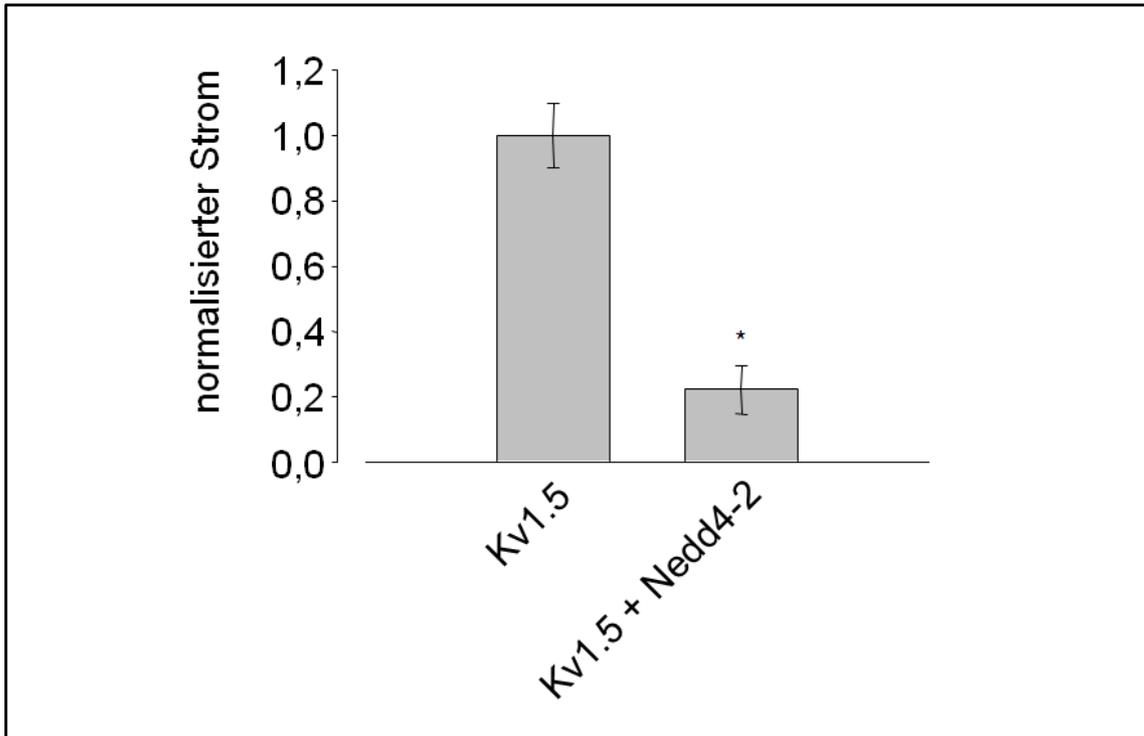
**Abbildung 40: Die SGK1 führt nicht zur Phosphorylierung des K<sub>v</sub>1.5 in *Xenopus laevis* Oozyten.** *Xenopus laevis* Oozyten wurden mit Wildtyp K<sub>v</sub>1.5 oder <sup>4x</sup>K<sub>v</sub>1.5 alleine oder zusammen mit <sup>S422D</sup>SGK1 injiziert. Immunopräzipitation der dargestellten Gruppen (A). Aufgezeigt ist die Bandenintensität mittels Densitometrie (B).

### 3.2.4 Nedd4-2 führt zur Ubiquitinierung des K<sub>v</sub>1.5

In einer früheren Studie konnte bereits gezeigt werden, dass der spannungsabhängige Kaliumkanal K<sub>v</sub>1.3 durch Nedd4-2 inhibiert wird. Nedd4-2 ist eine Ubiquitinligase, die dafür verantwortlich ist, dass Ionenkanalproteine von der Plasmamembran dem Abbau zugeführt werden. Nedd4-2 selbst ist ein Zielprotein der SGK1. Sie wird durch die SGK1 phosphoryliert und damit inaktiviert. Um herauszufinden, ob die SGK1 möglicherweise über eine Inhibition der Nedd4-2 seine Wirkung auf den K<sub>v</sub>1.5 zeigt, wurden Oozyten zur elektrophysiologischen Messung gebracht, die mit dem Kanal und der Ubiquitinligase koinjiziert worden waren.

Injizierte cRNA	% der Kontrolle ± SEM
K <sub>v</sub> 1.5 + Nedd4-2	22,3 ± 7,2

Tabelle 14: Normalisierter Strom in % ± SEM der Kontrollgruppe gegenüber der Gruppe K<sub>v</sub>1.5 alleine; n=15



**Abbildung 41: Die Expression der Ubiquitinligase Nedd4-2 führt zu einer Reduzierung des  $K_V1.5$ -Stromes.** *Xenopus laevis* Oozyten wurden mit Wildtyp  $K_V1.5$  alleine oder zusammen mit Nedd4-2 injiziert. Vier Tage nach der Injektion wurde der Strom mittels Voltage-Clamp bestimmt. Gezeigt ist das arithmetische Mittel  $\pm$  SEM, in jedem Einzelexperiment wurde dabei auf die Gruppe  $K_V1.5$  normalisiert. \* zeigt den statistisch signifikanten Unterschied zur Gruppe  $K_V1.5$  alleine ( $p < 0,05$ );  $n = 15$

Wie in Tabelle 14 und Abbildung 41 zu sehen ist, zeigte sich bei der Koexpression der beiden Proteine eine signifikante Abnahme des messbaren Stromes im Vergleich zur Kontrollgruppe.

In ergänzenden Experimenten wurde die Ubiquitinierung des Kaliumkanals untersucht. Dazu wurden zum einen Lysate aus den kompletten Zellen und zum anderen nur die Membranfraktion der Oozyten verwendet. Es wurde mittels einem Anti- $K_V1.5$ -Antikörper (Sigma, St. Louis, MO, USA) ein Immunopräzipitat gewonnen. Das Präzipitat wurde dann mittels „Western-Blot“ mit einem Antikörper gegen Ubiquitin (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) weiter verarbeitet. Die Ergebnisse sind in der nachstehenden Abbildung 42 und Abbildung 43 zu sehen.

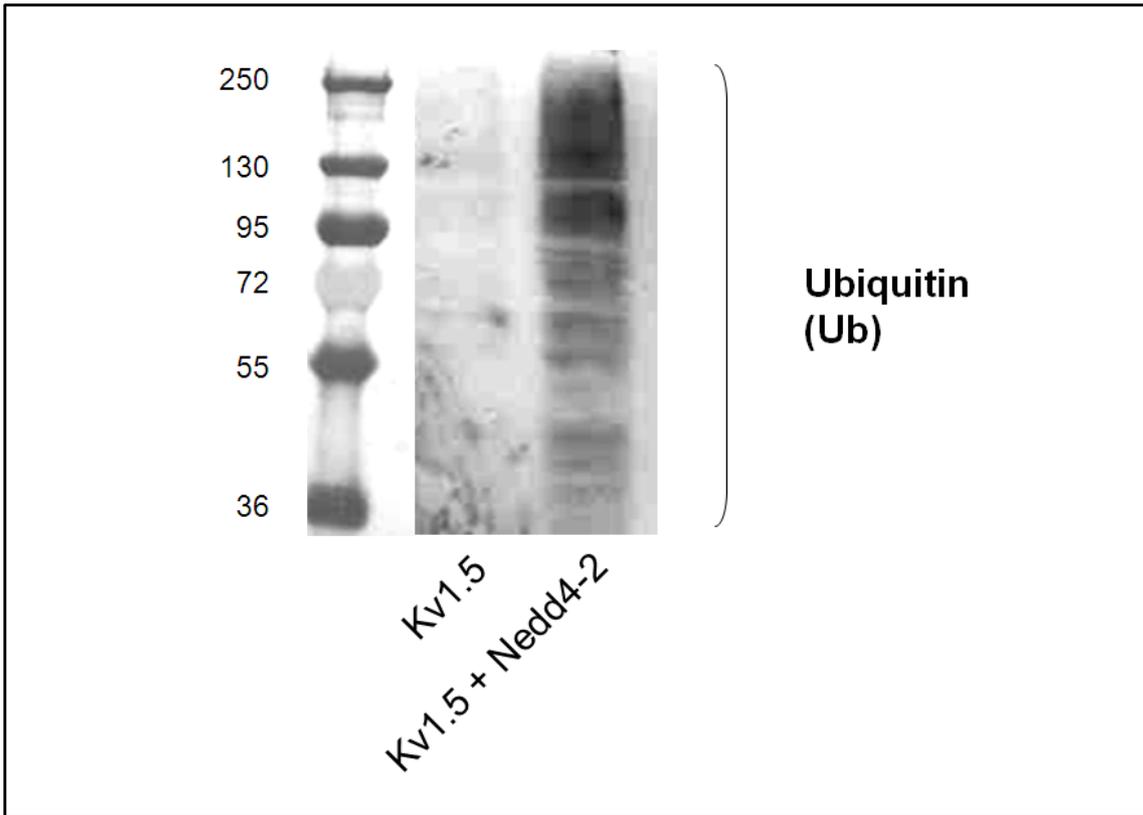


Abbildung 42: Nachweis der Ubiquitinierung aus Lysaten der kompletten Oozyte

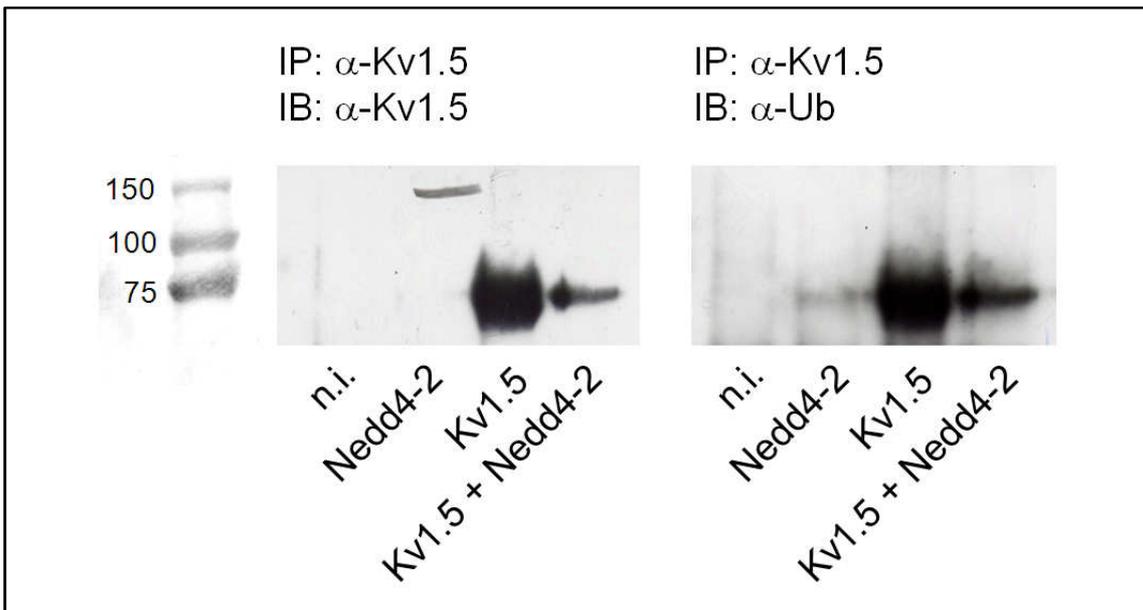


Abbildung 43: Nachweis der Ubiquitinierung aus der isolierten Plasmamembranfraktion nach der Coimmunoprecipitation des Kv1.5

Es zeigte sich sowohl in den Lysaten der kompletten Oozyten als auch in der untersuchten Membranfraktion mittels Coimmunopräzipitation, dass bereits in Zellen, die nur mit Kv1.5 injiziert waren, Ubiquitin nachgewiesen werden konnte. Das lag vermutlich an dem schon intrinsisch vorliegendem Nedd4-2.

Die Ubiquitinierung des Kv1.5 wurde zudem durch den UbiQapture™-Q kit gezeigt. Dieser Kit benutzt eine Matrix (affinity UbiQapture™-Q matrix), die ubiquitinierte Proteine binden kann. Die Plasmamembranfraktion der Oozyten wurde mit dieser Matrix inkubiert, die Ubiquitin binden kann. Anschließend wurden die präzipitierten Proteine (die Ubiquitin gebunden hatten) mit einem Antikörper gegen Kv1.5 versetzt. Mittels „Western-Blot“ konnte der Kv1.5 dann in Oozyten nachgewiesen werden, die mit Kv1.5 und Nedd4-2 koinjiziert worden waren. In Oozyten allerdings, die nicht mit cRNA injiziert worden waren, war der ubiquitinierte Kanal nicht nachweisbar. Dies beweist die Ubiquitinierung des Kanals durch die Nedd4-2 (siehe Abbildung 44).

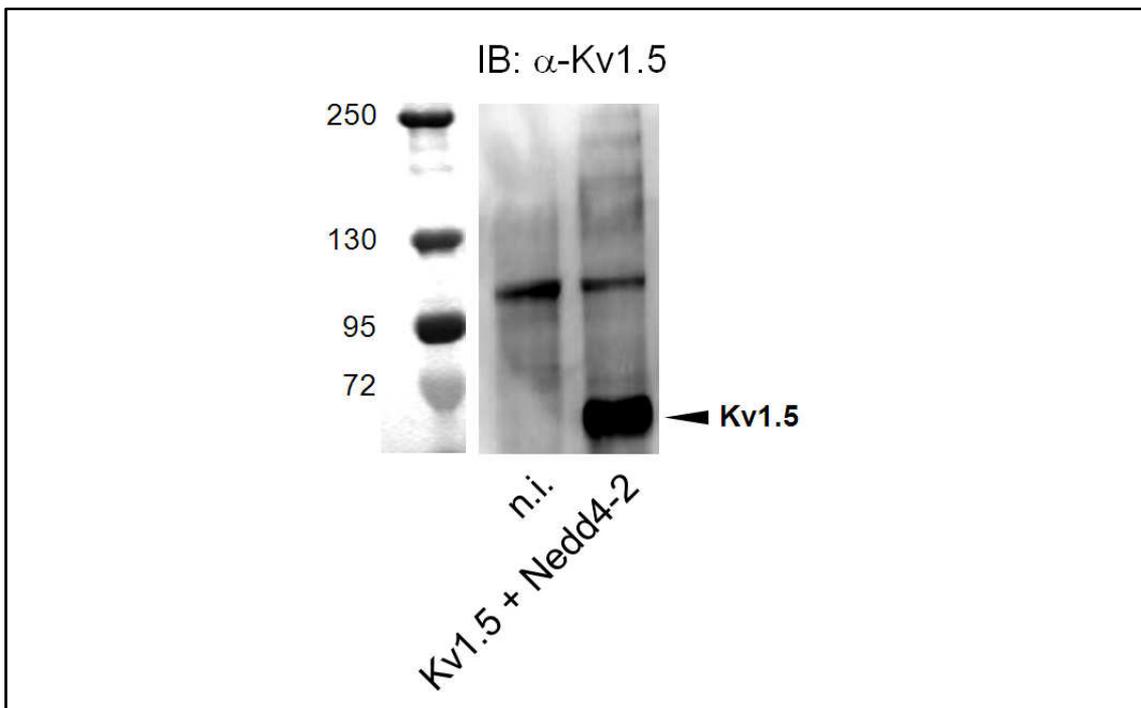
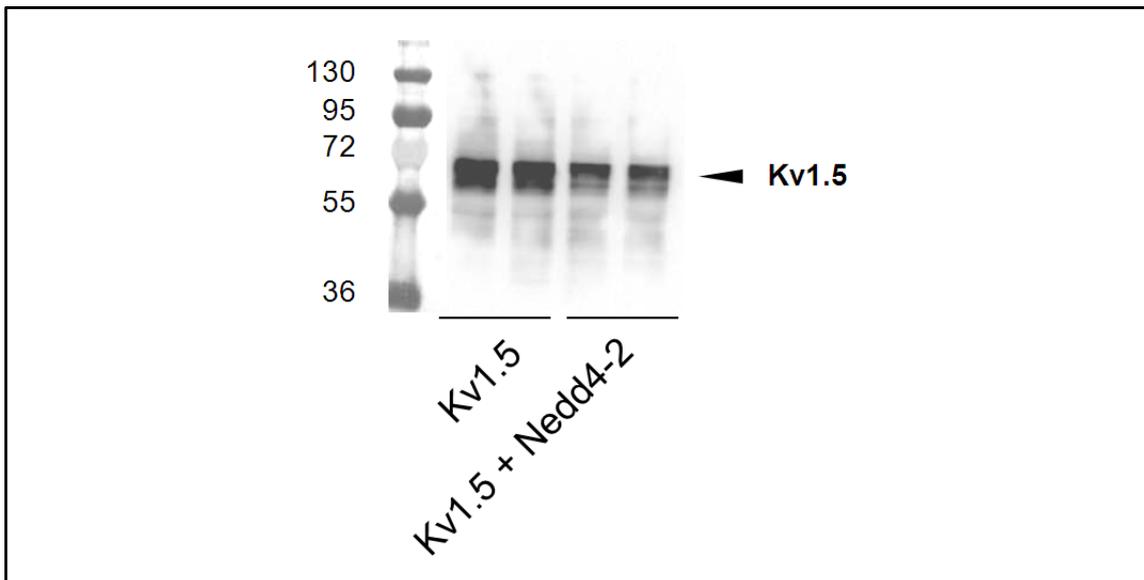


Abbildung 44: Nachweis der Ubiquitinierung mittels UbiQapture™-Q kit

Den funktionellen Ergebnissen, die aus der Voltage-Clamp Messung hervorgingen, sollte auch ein Korrelat gegenüberstehen. Dazu wurde die Proteinexpression in der Plasmamembranfraktion zwischen Gruppen verglichen, die nur mit  $K_v1.5$  alleine oder die mit  $K_v1.5$  und Nedd4-2 koinjiziert waren. Es wurden die nachfolgenden „Western-Blots“ angefertigt (siehe Abbildung 45).



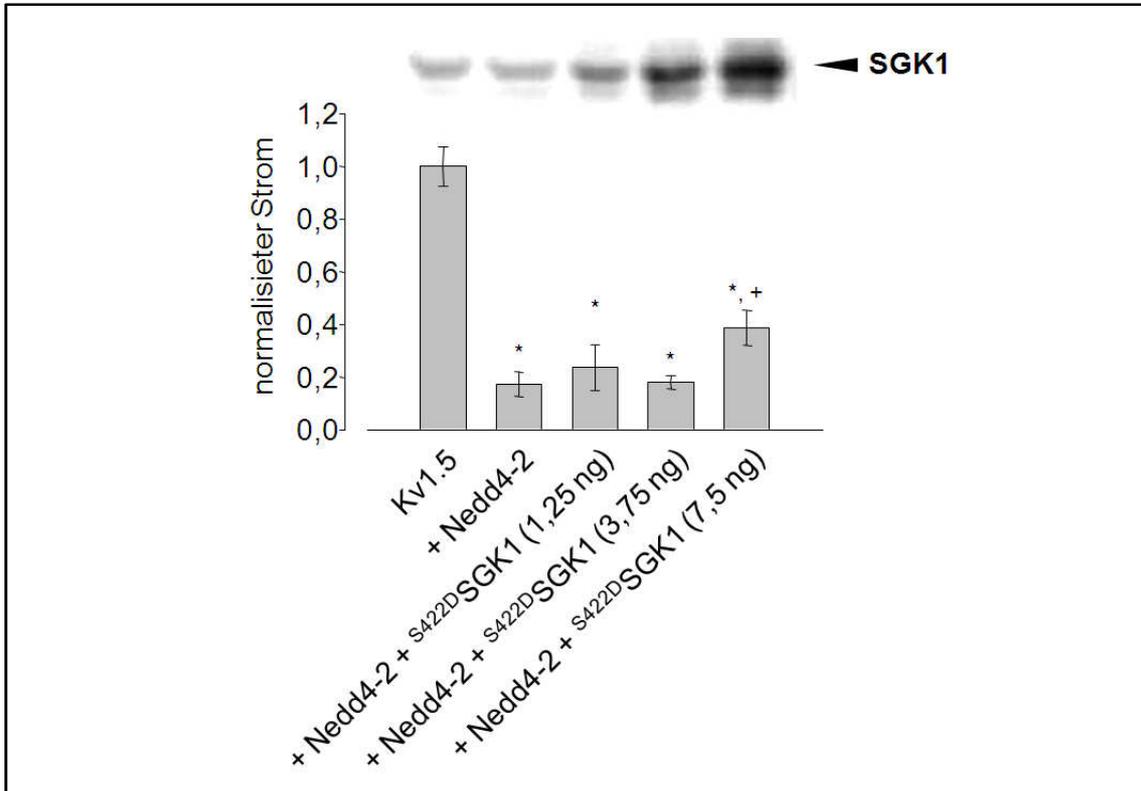
**Abbildung 45: Die Membranexpression des  $K_v1.5$  wird durch Nedd4-2 reduziert.** *Xenopus laevis* Oozyten wurden mit Wildtyp  $K_v1.5$  alleine und zusammen mit Nedd4-2 injiziert. Nach der Isolierung der Plasmamembran wurde von diesen Immunoblots erstellt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Menge an  $K_v1.5$  in der mit Nedd4-2 koinjizierten Gruppe geringer ausfiel, was auch mit den funktionellen Messungen korreliert.

### 3.2.5 SGK1 hemmt den Effekt der Nedd4-2

Um zu überprüfen, ob die SGK1 nun auf die Wirkung der Nedd4-2 und damit auf die Aktivität des  $K_v1.5$  Einfluss nehmen kann, wurde die SGK1 in

verschieden Konzentrationen in Oozyten injiziert, die zudem den  $K_V1.5$  und die Nedd4-2 exprimierten (siehe Abbildung 46).

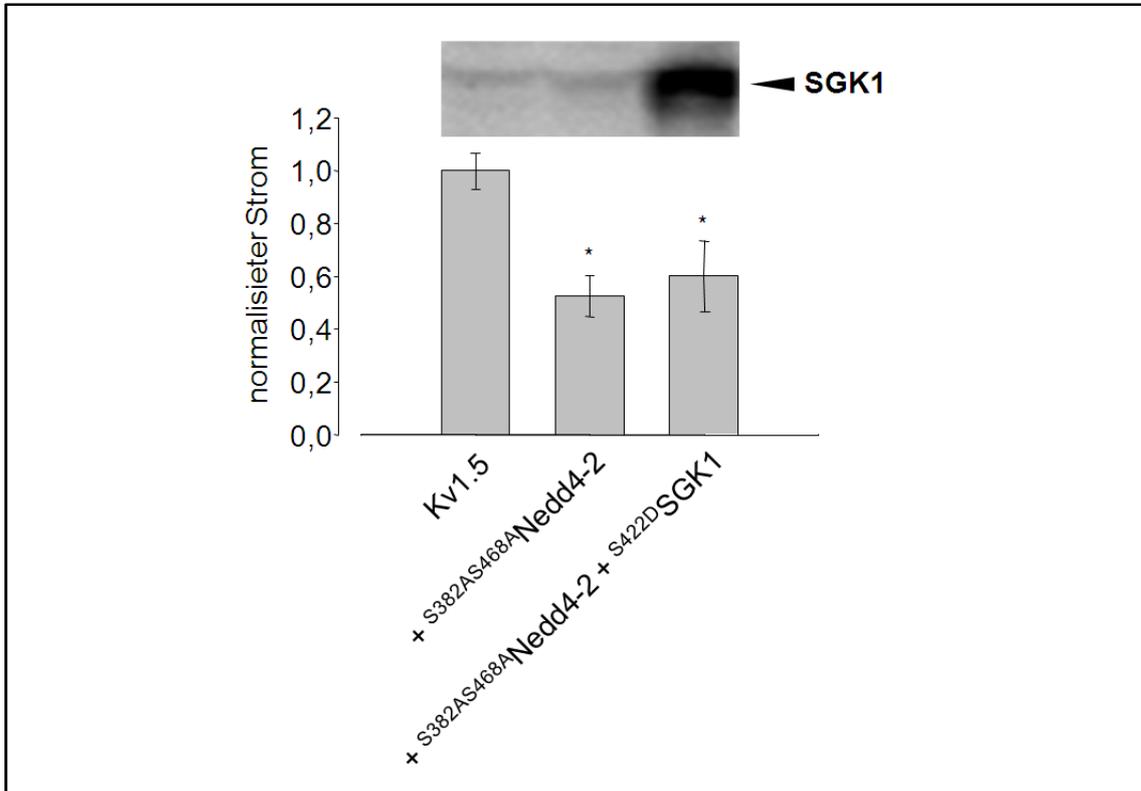


**Abbildung 46: Die  $S^{422D}$ SGK1 schwächt den Effekt der Nedd4-2 auf den  $K_V1.5$  ab.** *Xenopus laevis* Oozyten wurden mit  $K_V1.5$  alleine oder zusammen mit Nedd4-2 und/oder mit  $S^{422D}$ SGK1 in den gezeigten Mengen injiziert. Vier Tage nach der Injektion wurde der  $K_V1.5$ -Strom mittels Voltage-Clamp bestimmt. Zur Überprüfung der Expression der SGK1, wurde ein „Western-Blot“ aus den Zelllysaten hergestellt. Gezeigt ist das arithmetische Mittel  $\pm$  SEM, in jedem Einzelexperiment wurde dabei auf die Gruppe  $K_V1.5$  normalisiert. \* zeigt den statistisch signifikanten Unterschied gegenüber der Gruppe  $K_V1.5$  alleine ( $p < 0,05$ ). + zeigt den statistisch signifikanten Unterschied gegenüber der Gruppe  $K_V1.5$  + Nedd4-2 ( $p < 0,05$ );  $n = 15$

Die SGK1 ist in der Lage bei ansteigenden Konzentrationen den Effekt der Nedd4-2 abzuschwächen.

Zur genaueren Betrachtung wurde zudem eine Mutante der Nedd4-2 untersucht, die über keine funktionierende Phosphorylierungsstelle für die SGK1 mehr verfügt, und zwar die  $S^{382A}S^{468A}$ Nedd4-2. Die SGK1 sollte bei dieser Mutante keine Möglichkeit haben einen Einfluss auf ihre Aktivität zu nehmen.

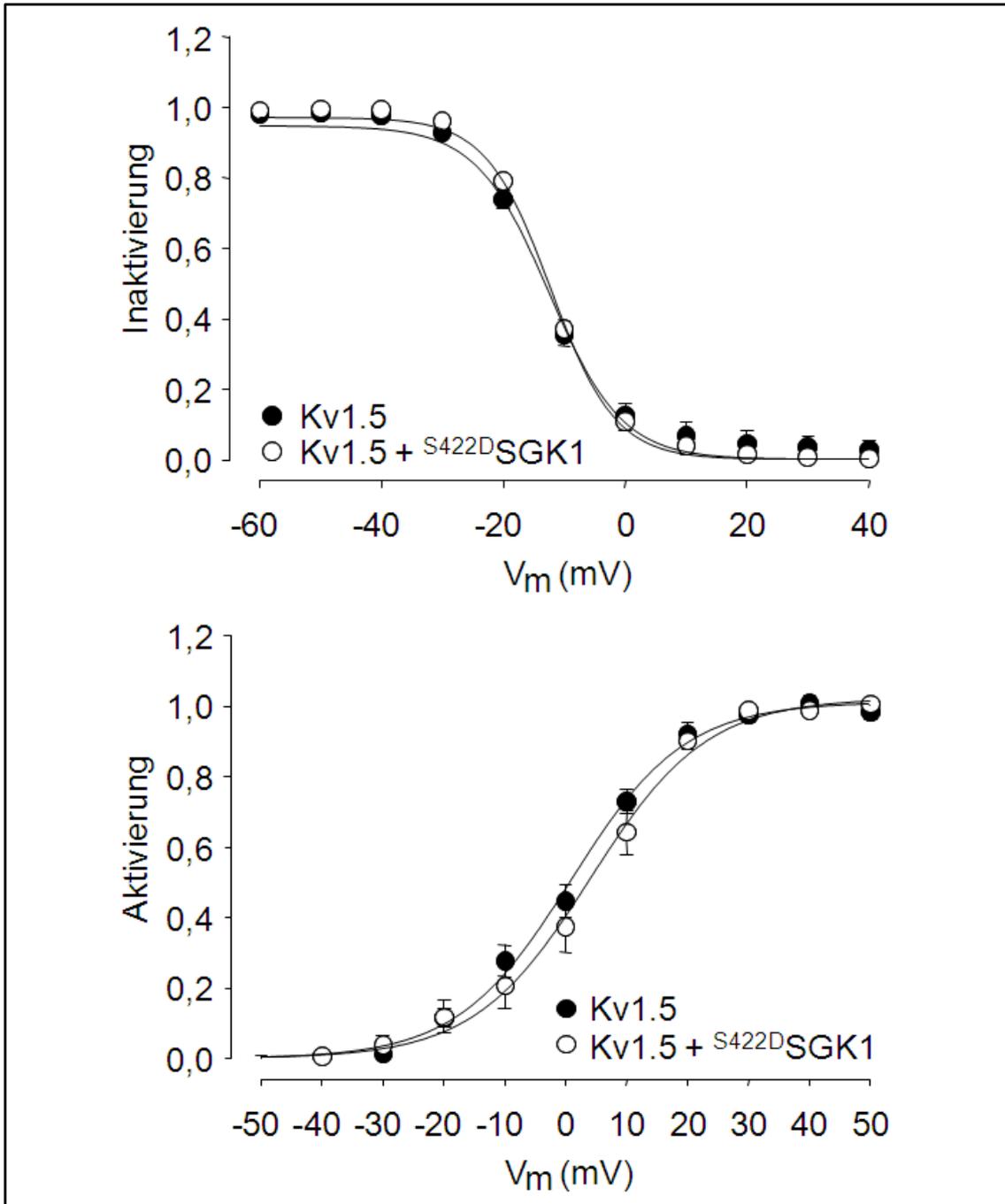
Die Mutante wurde mit und ohne SGK1 injiziert und der Strom der Gruppen per Voltage-Clamp gemessen (siehe Abbildung 47).



**Abbildung 47:** *Xenopus laevis* Oozyten wurden mit Wildtyp Kv1.5 alleine oder zusammen mit <sup>S382AS468A</sup>Nedd4-2 und/oder <sup>S422D</sup>SGK1 injiziert. Vier Tage nach der Injektion wurde der Kv1.5-Strom mittels Voltage-Clamp gemessen. Zur Überprüfung der Expression der SGK1, wurde ein „Western-Blot“ aus den Zelllysaten hergestellt. Gezeigt ist das arithmetische Mittel ± SEM, in jedem Einzelexperiment wurde dabei auf die Gruppe Kv1.5 normalisiert. \* zeigt den statistisch signifikanten Unterschied gegenüber der Gruppe Kv1.5 alleine (p<0,05); n=13

### 3.2.6 SGK1 verändert die Kanalkinetiken nicht

Um eine Einflussnahme der SGK1 auf die Aktivierungs- und Inaktivierungskinetiken zu untersuchen, wurden weitere Experimente durchgeführt. Dazu wurde der Kanal mit und ohne SGK1 exprimiert und elektrophysiologisch die Kinetiken analysiert (siehe Abbildung 48).

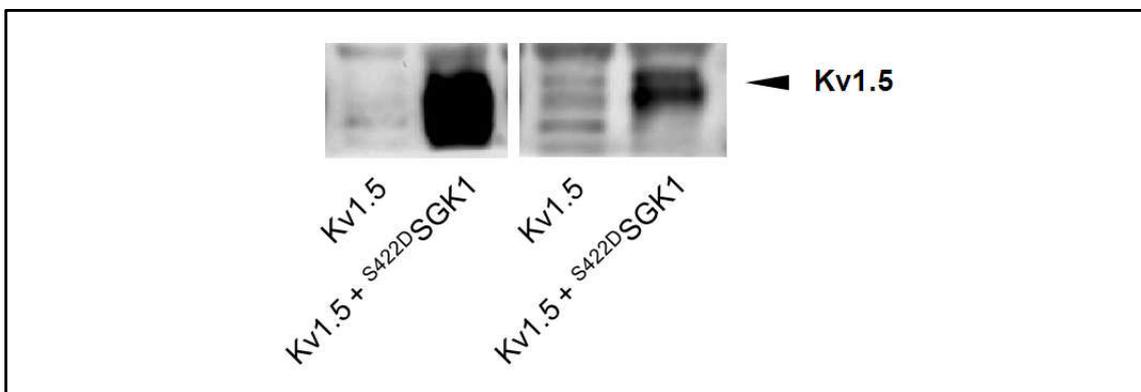


**Abbildung 48: Die Expression der <sup>S422D</sup>SGK1 hat keinen Effekt auf die Kanalkinetiken des Kv1.5.** *Xenopus laevis* Oozyten wurden mit Kv1.5 alleine und zusammen mit <sup>S422D</sup>SGK1 injiziert. Vier Tage nach der Injektion wurden die Kinetiken mittels Voltage-Clamp bestimmt. Dargestellt sind das arithmetische Mittel  $\pm$  SEM.

Wie zu sehen ist, gab es keine Verlagerung der Aktivierung bzw. Inaktivierung bei Koexpression mit der Kinase.

### 3.2.7 SGK1 stabilisiert den K<sub>V</sub>1.5 in der Plasmamembran

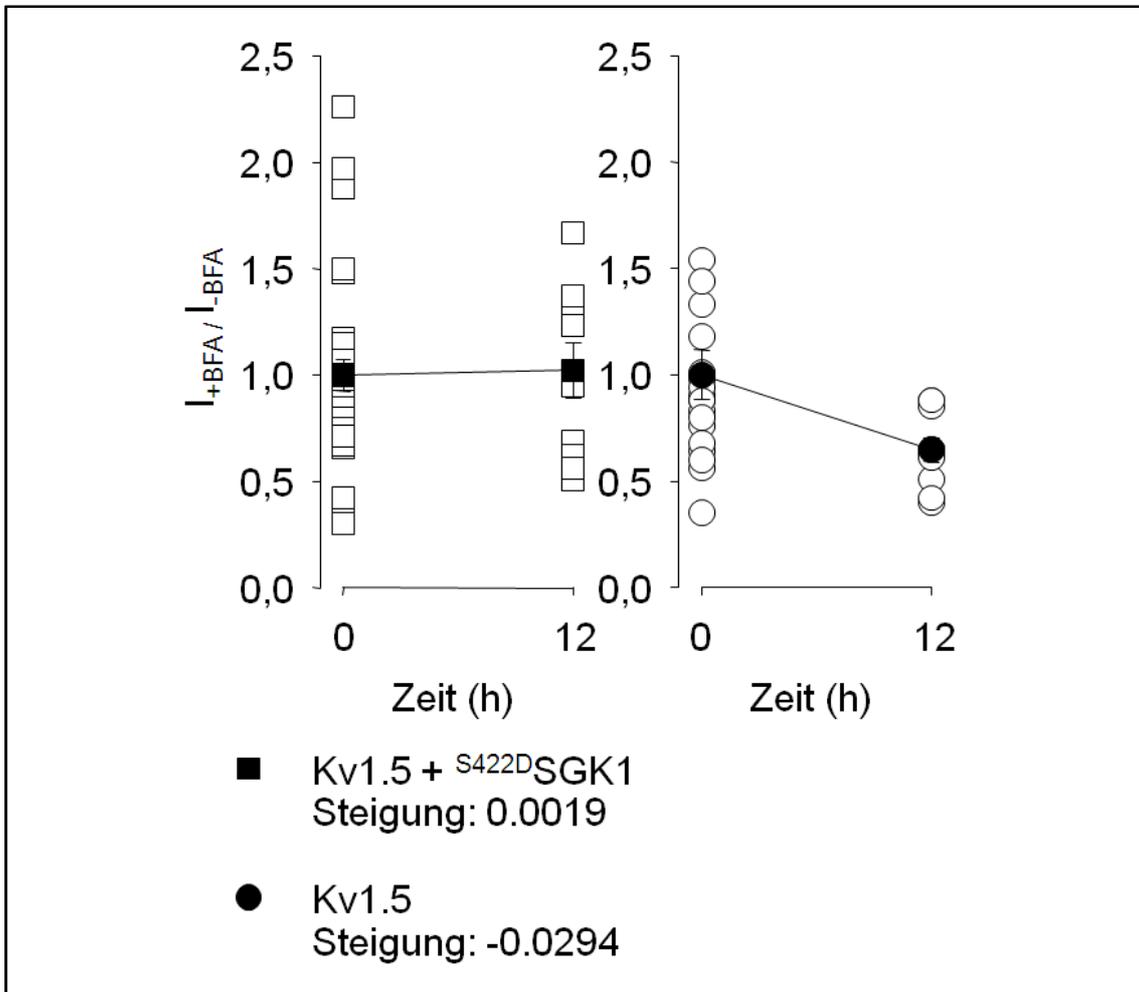
Um festzustellen, ob die SGK1 die Membranexpression des K<sub>V</sub>1.5 erhöht, wurden Immunoblots angefertigt. Wie in Abbildung 49 gezeigt, hat eine Koinjektion der SGK1 den Effekt, dass sich die Kanaldichte in der Plasmamembran erhöhte. Diese Ergebnisse sind mit den funktionellen Resultaten aus der Voltage-Clamp-Messung gut zu vereinbaren.



**Abbildung 49: Die SGK1 stabilisiert den K<sub>V</sub>1.5 in der Plasmamembran.** *Xenopus laevis* Oozyten wurden mit Wildtyp K<sub>V</sub>1.5 alleine oder zusammen mit <sup>S422D</sup>SGK1 injiziert. Die isolierten Plasmamembranen wurden mittels „Western-Blot“ untersucht.

Die SGK1 könnte die erhöhte Expression des K<sub>V</sub>1.5 durch zwei Mechanismen erreichen. Zum einen indem es zu einem gesteigertem Einbau des Kanals in die Membran kommt oder zum anderen indem der Abbau bereits vorhandener Kanalproteine verlangsamt wird. Es könnte auch eine Kombination aus beiden Mechanismen vorherrschen. Um zwischen den beiden Mechanismen unterscheiden zu können, wurden Experimente mit Brefeldin A (BFA), das den anterograden Transport vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat blockiert und damit den Nachschub von neuen Kanalproteinen zur Membran stoppt, vollzogen. Oozyten wurden mit K<sub>V</sub>1.5 alleine oder mit SGK1 koinjiziert und in BFA (5 μM) inkubiert. Direkt vor der Inkubation und nach 12 Stunden

wurden Oozyten entnommen und elektrophysiologisch gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 50 aufgetragen.



**Abbildung 50:** <sup>S422D</sup>SGK1 bewerkstelligt die erhöhte Plasmamembranexpression durch eine Stabilisierung des Kanals in der Plasmamembran. *Xenopus laevis* Oozyten wurden mit Wildtyp Kv1.5 alleine oder zusammen mit <sup>S422D</sup>SGK1 injiziert. Vier Tage nach Injektion wurde mittels Voltage-Clamp der Kv1.5-Strom in Oozyten bestimmt, die für 12 h in Brefeldin A inkubiert worden waren. Aufgetragen ist das Stromverhältnis von Oozyten, die in BFA inkubiert worden waren gegenüber Oozyten, die in ND 96 inkubiert worden waren. Arithmetisches Mittel  $\pm$  SEM.

Die Inkubation mit Brefeldin A führte zu einem signifikanten sukzessiven Abfallen des messbaren Stromes nach 12 h in der Kontrollgruppe. Die mit SGK1 koinjizierten Zellen zeigten keinen solchen Effekt. Diese Ergebnisse

sprechen dafür, dass die SGK1 stabilisierend auf die Kanalproteine in der Membran einwirkt.

## 4 Diskussion

### 4.1 Fehlerdiskussion

#### 4.1.1 Expression in *Xenopus laevis* Oozyten

Wie bereits oben erwähnt, werden *Xenopus laevis* Oozyten in der Forschung breit angewendet um Ionenkanäle und Membrantransporter zu studieren. Ein Hauptproblem der elektrophysiologischen Untersuchungen liegt bei der Interpretation der Ergebnisse, da die Oozyten selbst über intrinsisch vorkommende Ionenkanäle und regulatorische Proteine verfügen.

Jedoch ist die Menge an intrinsisch vorkommenden Proteinen im Vergleich zu den injizierten Proteinen verschwindend gering (40). Daher sind die Ergebnisse fast nur von der Expression der injizierten Proteine abhängig. Grenzen bei der Übertragbarkeit auf mammalische Zellen bieten sich vor allem durch folgende Gründe. Zum einen kann nicht ausgeschlossen werden, dass die posttranslatorischen Modifikationen nicht denen in mammalischen Zellen entsprechen und zum anderen können sich die Signalkaskaden in *Xenopus laevis* Oozyten von denen in mammalischen Zellen unterscheiden (133).

#### 4.1.2 Oozyten und cRNA

Die Qualität der Oozyten unterlag großen Schwankungen, die sich aus den folgenden Gründen ergaben. Die Qualität war von dem Frosch an sich abhängig, von der Präparation, der Raumtemperatur und schließlich von der Qualität der Lösungen. Dementsprechend wurde darauf geachtet, die entsprechenden Störfaktoren auszuschalten. Zudem wurden die Oozyten täglich kontrolliert und beschädigte Oozyten aussortiert. Zur Messung wurden ausschließlich Zellen benutzt, die ein unbeschädigtes Erscheinungsbild und keinen hohen basalen Leckstrom boten. Zudem wurde jedes Experiment drei Mal durchgeführt um eventuelle Qualitätsunterschiede auszugleichen.

Eine weitere Fehlerquelle lag in der injizierten cRNA. Die Stammlösung wurde bei -80 °C aufbewahrt und vor der Injektion auf die Zielkonzentration verdünnt. Dabei konnte es theoretisch zu Ungenauigkeiten beim Pipetieren im µl-Bereich kommen. Andere Fehler konnten durch Verunreinigungen auftreten, die zur Degradation der cRNA hätten führen können. Beim Injizieren der cRNA mittels des Mikroinjektors konnten auch geringste Schwankungen auftreten, jedoch wurde dies durch die korrekte Bedienung des Injektors versucht zu verhindern. Trotz des Versuchs diese Fehler zu vermeiden, war die Expressionsrate des Kv1.5 nicht in allen Experimenten gleich groß, daher wurde jedes Experiment für sich normalisiert um die verschiedenen Experimente miteinander vergleichen zu können.

### **4.1.3 Verwendete Lösungen**

Die verwendeten Lösungen wurden meist als Stammlösung unter Kontrolle von Osmolarität und pH angesetzt. Nach dem Verdünnen auf die Endkonzentration wurde erneut die Osmolarität und der pH überprüft. Die Stammlösungen wurden lichtgeschützt im Kühlschrank oder Gefrierschrank aufbewahrt um ein zu schnelles Verunreinigen oder eine Degradation auszuschließen. Nicht zu übersehen waren die beim Herstellungsprozess möglicherweise verunreinigten Substanzen der jeweiligen Hersteller, was jedoch als sehr unwahrscheinlich galt.

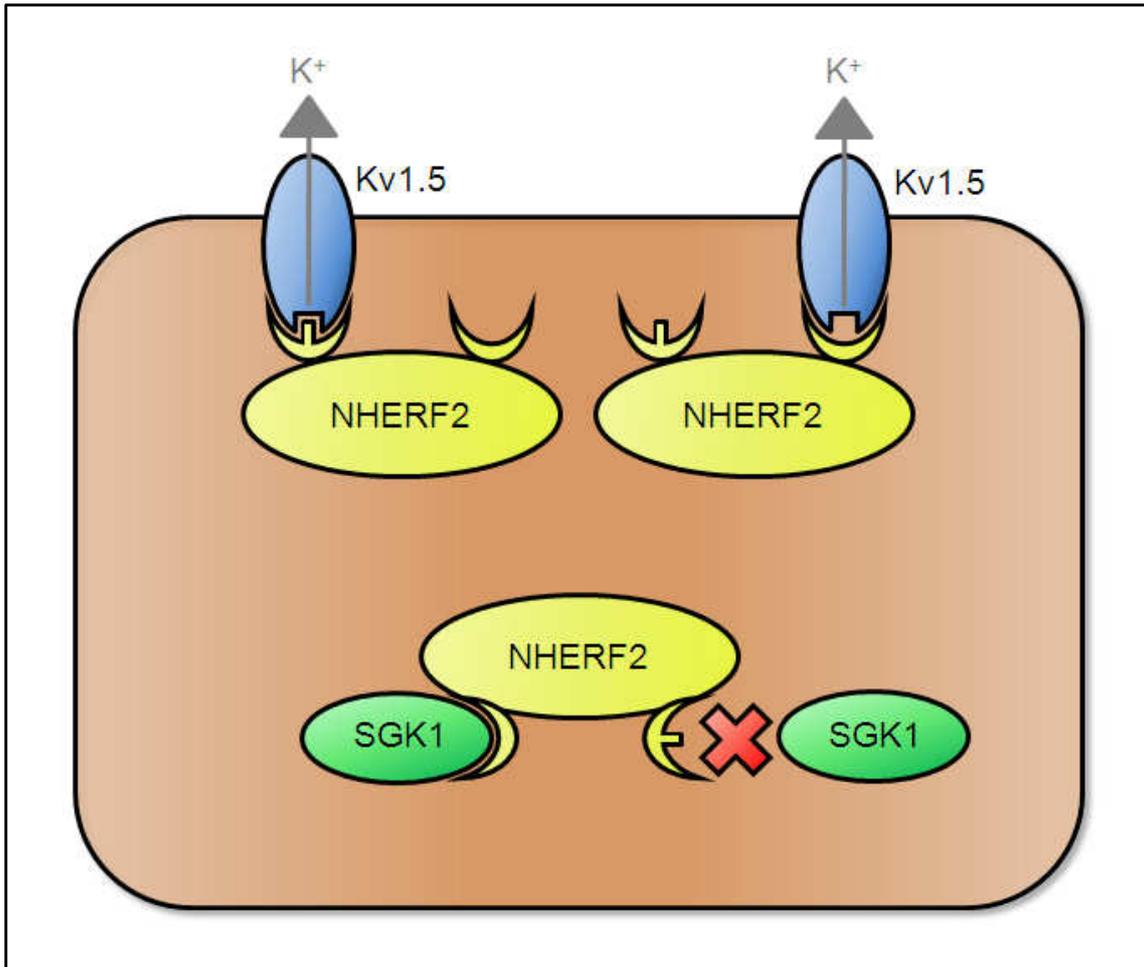
### **4.1.4 Elektrophysiologischer Messplatz**

Da die Messapparatur sehr schwingungsanfällig war, wurde sie auf einem schwingungsarmen Tisch platziert. Zur Abschirmung vor elektromagnetischer Strahlung wurde die Messung in einem Faradayschen Käfig vorgenommen und alle metallischen Gegenstände im Faradayschen Käfig wurden geerdet (siehe Abbildung 10). Weiterhin war wichtig, dass das Superfusat in gleichmäßigem Tempo durch die Messkammer floss. Verunreinigungen im Leitungssystem hätten hier zu Problemen führen können, daher wurde nach jedem Messtag das

System gründlich mit 70 %igem Ethanol und destilliertem Wasser gespült. Ein weiterer potentieller Störfaktor waren die Glaselektroden. Der Widerstand der Elektroden wurde vor jeder Messung kontrolliert und die Elektroden bei Widerständen unter 0,1 M $\Omega$  und über 1,5 M $\Omega$  ausgetauscht.

#### **4.2 Molekulare Mechanismen der Stimulation durch NHERF1/2**

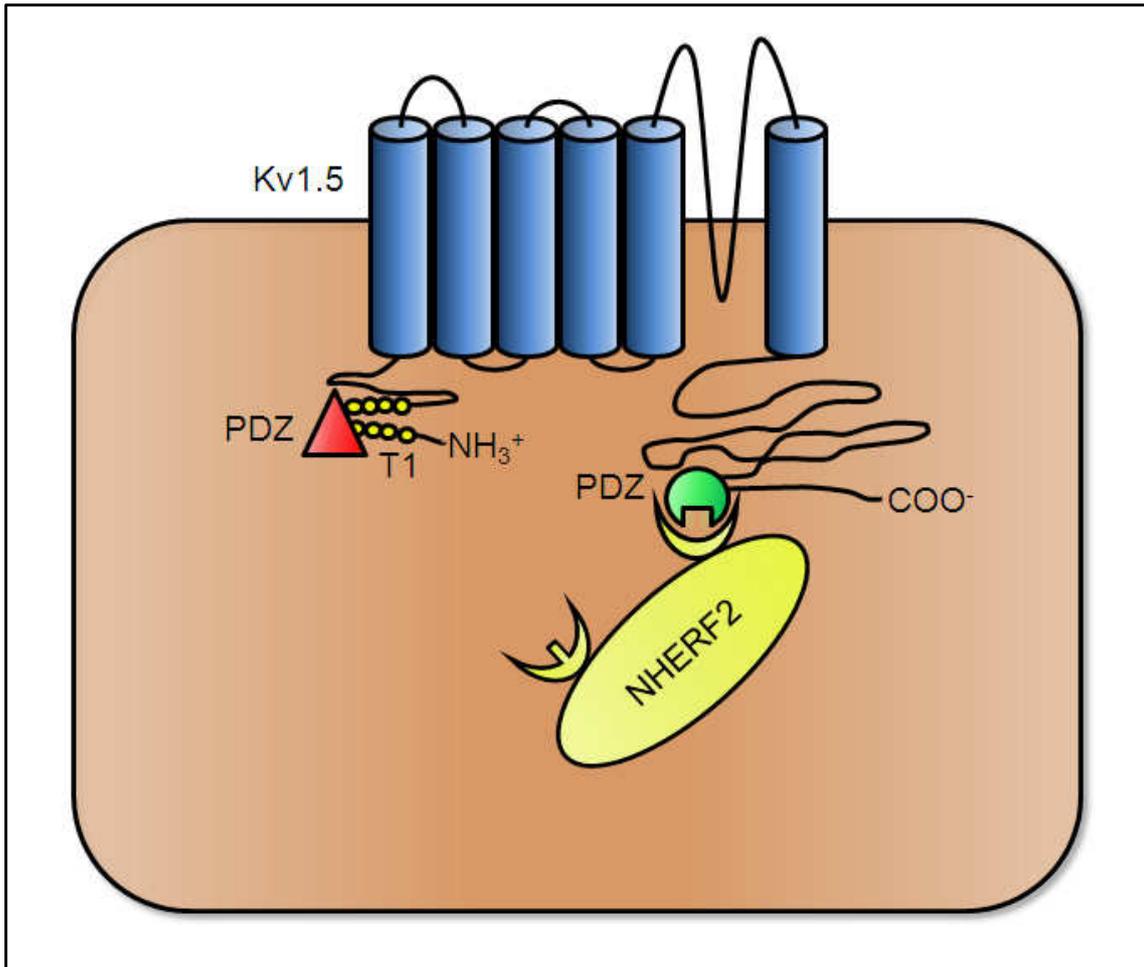
Das Ziel der Experimente war, die Rolle der Gerüstproteine NHERF1 und NHERF2 bei der Regulation des spannungsabhängigen Kaliumkanals K<sub>v</sub>1.5 zu eruieren und auch den molekularen Mechanismus der Regulation genauer zu beleuchten. Verschiedene Studien haben schon gezeigt, dass NHERF2 eine klare Spezifität in den gebundenen Proteinen hat und sich dadurch auch in seiner physiologischen Funktion von seinem Verwandten NHERF1 unterscheidet (129). In den jetzt durchgeführten Experimenten wird K<sub>v</sub>1.5 als Ziel beider Isoformen, NHERF1 und NHERF2, identifiziert. Die beiden PDZ-Domänen des NHERF1 zeigen Affinität zu bestimmten Peptidsequenzen. Die erste Domäne bindet dabei vornehmlich an C-terminale Motive mit D-S/T-X-L und die zweite PDZ-Domäne an C-terminale Motive mit S-S/T-W-L (67, 147). Die genaue Spezifität der zwei PDZ-Domänen des NHERF2 sind noch nicht bekannt. Es konnte jedoch schon gezeigt werden, dass verschiedene Proteine nur an eine der beiden PDZ-Domänen binden (129). Nach den jetzt aktuell erhobenen Ergebnissen wirkt NHERF2 über beide PDZ-Domänen auf den Kaliumkanal K<sub>v</sub>1.5. Es zeigt sich, dass NHERF2 durch eine Stabilisierung des K<sub>v</sub>1.5 dessen Strom erhöht (siehe Abbildung 26).



**Abbildung 51: Schematische Darstellung der Interaktion des NHERF2 mit dem Kv1.5.** Gezeigt ist, dass NHERF2 entweder über die erste oder über die zweite PDZ-Domäne an den Kv1.5 bindet. Im Gegensatz dazu kann die SGK1 nur über die zweite PDZ-Domäne mit NHERF2 interagieren.

Der spannungsabhängige Kaliumkanal Kv1.5 verfügt über zwei PDZ-Bindemotive. Ein Bindemotiv befindet sich am C-Terminus (E-T-D-L) und das andere stellt ein internes Bindemotiv dar, das nahe der T1-Region des Kv1.5 liegt (50). Die T1-Domäne (Tetramerisation 1) ist eine stark konservierte Domäne im N-terminalen cytoplasmatischen Bereich von spannungsabhängigen Kaliumkanälen. Diese Domäne ist von unersetzbarer Wichtigkeit für den korrekten Zusammenbau der  $\alpha$ -Untereinheiten zu einem Tetramer und damit wichtig um einen funktionierenden Kanal zu bilden (128). Eine Störung des N-terminalen PDZ-Bindemotiv (Kv1.5 $\Delta$ N) führte dazu, dass die Kv1.5-Ströme kaum mehr messbar waren (siehe Abbildung 21). Zu erklären

wäre dies durch eine stark verringerte Expression der Kanalproteine durch eine Störung der T1-Domäne. Eine weitere Erklärung beinhaltet das PDZ-Protein SAP97. Studien bewiesen, dass es die  $K_V1.5$ -Ströme durch eine indirekte Interaktion mit dem N-Terminus erhöht (49). Folglich könnte es sein, dass die Mutante ( $K_V1.5\Delta N$ ) weniger stark exprimiert werden konnte, weil die Regulation durch intrinsisch vorkommendes SAP97 nicht erfolgen konnte. Wie erwähnt trägt der N-Terminus von  $K_V$ -Kanälen Sequenzen, die essentiell sind für den korrekten Zusammenbau der vier Untereinheiten zu einem funktionierenden Ionenkanal (39) oder auch wichtig sind für die Assoziation mit regulatorischen Proteinen wie  $\alpha$ -Actinin-2 (37). Auf dieser Grundlage könnte die Entfernung des internen PDZ-Bindemotivs die Expression und auch das Gating des Kanals beeinflussen. Die  $K_V1.5$ -Mutante ohne funktionierendes C-terminales PDZ-Bindemotiv ( $K_V1.5\Delta C$ ) zeigte leicht höhere Ströme als der Wildtyp. Diese Beobachtung wurde bereits von Eldstrom (50) gemacht. Die Ströme, die nach Injektion dieser Mutante zu messen waren, wurden durch die Koexpression mit NHERF2 nicht mehr verstärkt. Das legt die Vermutung nahe, dass NHERF2 über das C-Terminale PDZ-Bindemotiv des  $K_V1.5$  seine Wirkung entfaltet. Das C-Terminale PDZ-Bindemotiv ist auch an der Regulation durch PSD95, auch ein PDZ-Domänen tragendes Protein, beteiligt. Jedoch erhöht PSD95 die  $K_V1.5$ -Ströme nur bei entferntem N-Terminus (50).

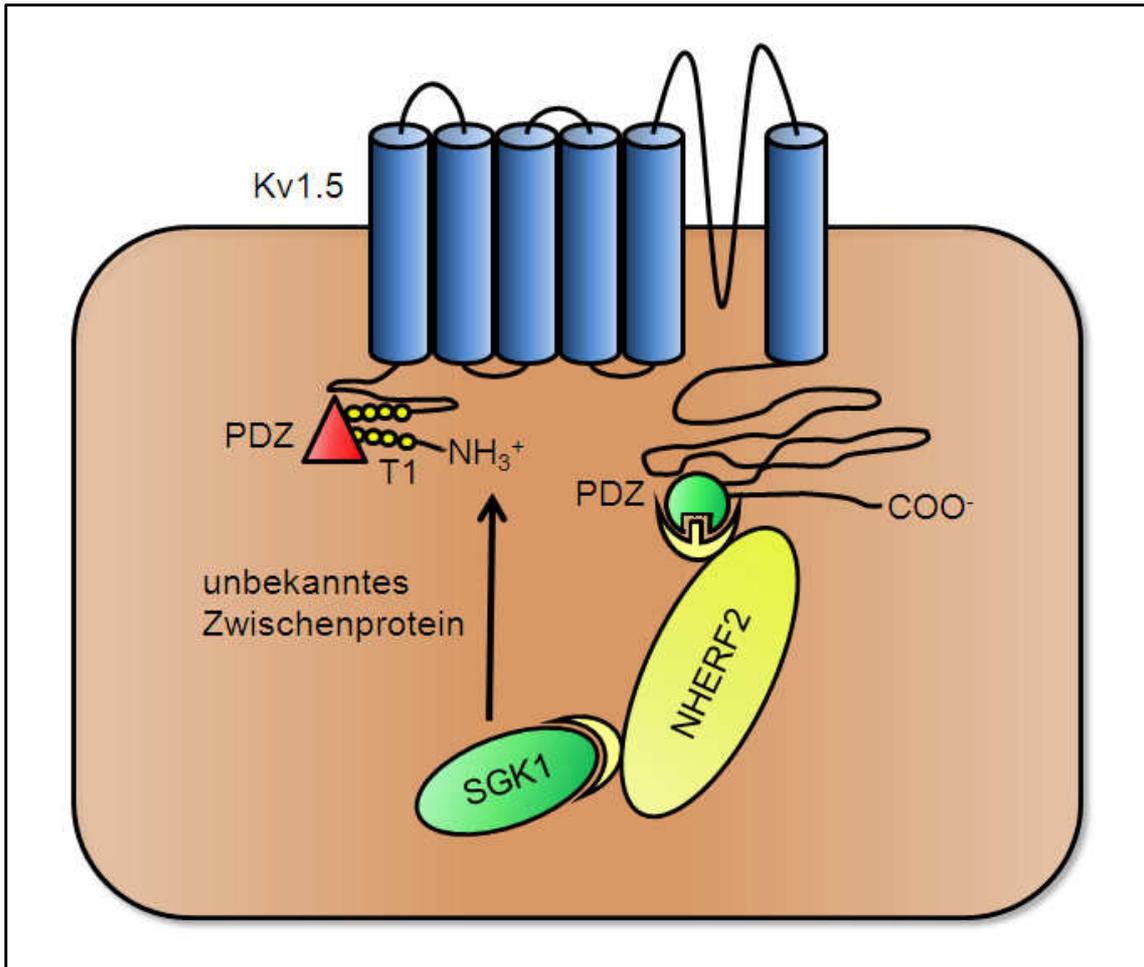


**Abbildung 52: Schematische Darstellung der Interaktion des NHERF2 mit dem Kv1.5.** Gezeigt ist der Kv1.5 mit seinen sechs Transmembrandomänen, der T1-Domäne, dem N-terminalen PDZ-Bindemotiv und das NHERF2 mit seinen beiden PDZ-Domänen. NHERF2 nimmt die Bindung zu Kv1.5 über dessen C-terminales PDZ-Bindemotiv, nicht über das N-terminale auf.

Die Bindung, die NHERF2 zum Cytoskelett aufbaut, dient der Sortierung und Ortsbestimmung von Membranproteinen. Eine weitere Funktion des NHERF2 ist es, die Gruppierung von Signalproteinen zu vermitteln um die zellulären Signaltransduktionsprozesse zu ermöglichen. Zudem agiert NHERF2 als Gerüstprotein um Proteinkinasen in die Nähe von Ionenkanälen und Membrantransportern zu bringen und diese zu aktivieren (111, 137, 138, 150, 155, 156). Es ist bekannt, dass NHERF2 den K<sup>+</sup>-Kanal ROMK und den Ca<sup>2+</sup>-Kanal TRPV5 durch die eben erwähnte strukturgebende Funktion stimuliert, indem die Proteinkinase SGK1 in Nähe der Kanäle gebracht wird und es dann zur Phosphorylierung und Aktivierung der Kanäle kommt (111, 154, 156). In der

vorliegenden Arbeit kann gezeigt werden, dass NHERF2 mit der SGK1 einen synergistischen Effekt auf den  $K_V1.5$  haben. Die Interaktion zwischen der SGK1 und NHERF2 geschieht über die zweite PDZ-Domäne des NHERF2 (siehe Abbildung 30 und Abbildung 33). Im Gegensatz jedoch zu vorangegangenen Studien ist die SGK1 auch alleine in der Lage den  $K_V1.5$ -Strom zu erhöhen. Die angefertigten „Western-Blots“ (Abbildung 25) zeigen einen massiven Anstieg der Kanalmenge in der Plasmamembran verglichen mit dem nur moderaten Anstieg des messbaren Stromes in der Voltage-Clamp-Messung (Abbildung 16). Folglich könnte die Masse an Kanal, die durch NHERF2 an die Plasmamembran gebracht wurde, eine weitere Aktivierung durch akzessorische Proteine wie z.B. die SGK1 benötigen. In der Tat zeigt sich, dass der Effekt von NHERF2 auf  $K_V1.5$  durch die zusätzliche Expression von SGK1 noch weiter verstärkt wird. Das legt die Vermutung nahe, dass die Kinase auch  $K_V1.5$ -Kanäle stimulieren kann, die sich bereits in der Plasmamembran befinden.

Viele verschiedene C-terminale PDZ-Bindemotive verfügen über ein Serin- und/oder Threoninrest (X-S/T-X-V/L), der durch Serin- oder Threoninkinasen phosphoryliert werden könnte. Durch die Phosphorylierung an dieser Stelle könnte theoretisch die Bindungsaffinität für die NHERF-Isoformen beeinflusst werden (25). Das C-terminale PDZ-Bindemotiv des  $K_V1.5$  (E-T-D-L) enthält sogar ein Threoninrest, der mitten in einer möglichen SGK1-Konsensussequenz liegt (112). In der Sequenz des  $K_V1.5$  finden sich noch drei weitere mögliche SGK1-Konsensussequenzen. Die Mutation von allen vier möglichen Phosphorylierungsstellen hatte keinen Effekt auf die Stimulation der SGK1 auf  $K_V1.5$  (siehe Abbildung 38). Diese Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass NHERF2 wohl die SGK1 in die Nähe des  $K_V1.5$  bringt, jedoch die SGK1 den Kanal nicht direkt phosphoryliert, sondern seine Wirkung über ein bis dato noch unbekanntes Protein entfaltet.



**Abbildung 53: Schematische Darstellung der Interaktion des NHERF2 mit der SGK1 und dem Kv1.5.** NHERF2 bringt die SGK1 über die zweite PDZ-Domäne in räumliche Nähe zum Kv1.5, die SGK1 wirkt jedoch nicht direkt auf den Kv1.5, sondern benötigt zur Stimulation ein bis dato unbekanntes Zwischenprotein.

Mutationen in kardialen spannungsabhängigen K<sup>+</sup>-Kanälen werden in Verbindung gebracht mit dem Long-QT-Syndrom, kardialen Arrhythmien und dem plötzlichen Herztod (134). So führt der Kv1.5-Gentransfer in einem Mausmodell mit Long-QT-Syndrom zu einer Normalisierung der Aktionspotentialdauer und einer Verkürzung der QT-Zeit (20). Folglich könnte eine erhöhte Expressionsrate durch NHERF2 und SGK1 zu einem Short-QT-Syndrom führen. In der Tat existiert eine Genvariante der SGK1 (E8CC/CT-I6CC), die mit einer erhöhten Expressionsrate der SGK1 (22, 23) und auch mit einem Short-QT-Syndrom einhergeht (24). Des Weiteren spielt die SGK1 abhängige Regulation des Kv1.5 eine Rolle bei der durch Glukokortikoide

vermittelten geringeren Insulinsekretion der pankreatischen Betazellen (140). Interessanterweise ist die gleiche SGK1 Genvariante (E8CC/CT-I6CC), die zu einer erhöhten SGK1 Expression führt auch mit einem erhöhten Risiko für Diabetes Mellitus assoziiert. Die Regulation des  $K_V1.5$  durch NHERF2 und SGK1 könnte bei Trägern dieser Genvariante für das verkürzte QT-Intervall und das erhöhte Diabetesrisiko mitverantwortlich sein.

Schlussfolgernd lässt sich mit diesem Teil der Arbeit sagen, dass NHERF2 die Aktivität und Expression durch eine Stabilisierung in der Plasmamembran erhöht. Um auf den Kanal einwirken zu können, benötigt NHERF2 das C-terminale PDZ-Bindemotiv des  $K_V1.5$ . Weiterhin konnte aufgezeigt werden, dass NHERF2 synergistisch mit der SGK1 auf den  $K_V1.5$  wirkt. Die Daten bringen einen neuen Regulationsmechanismus des  $K_V1.5$  ans Licht, der in der Kontrolle der Kanalfunktion eine Rolle spielen könnte.

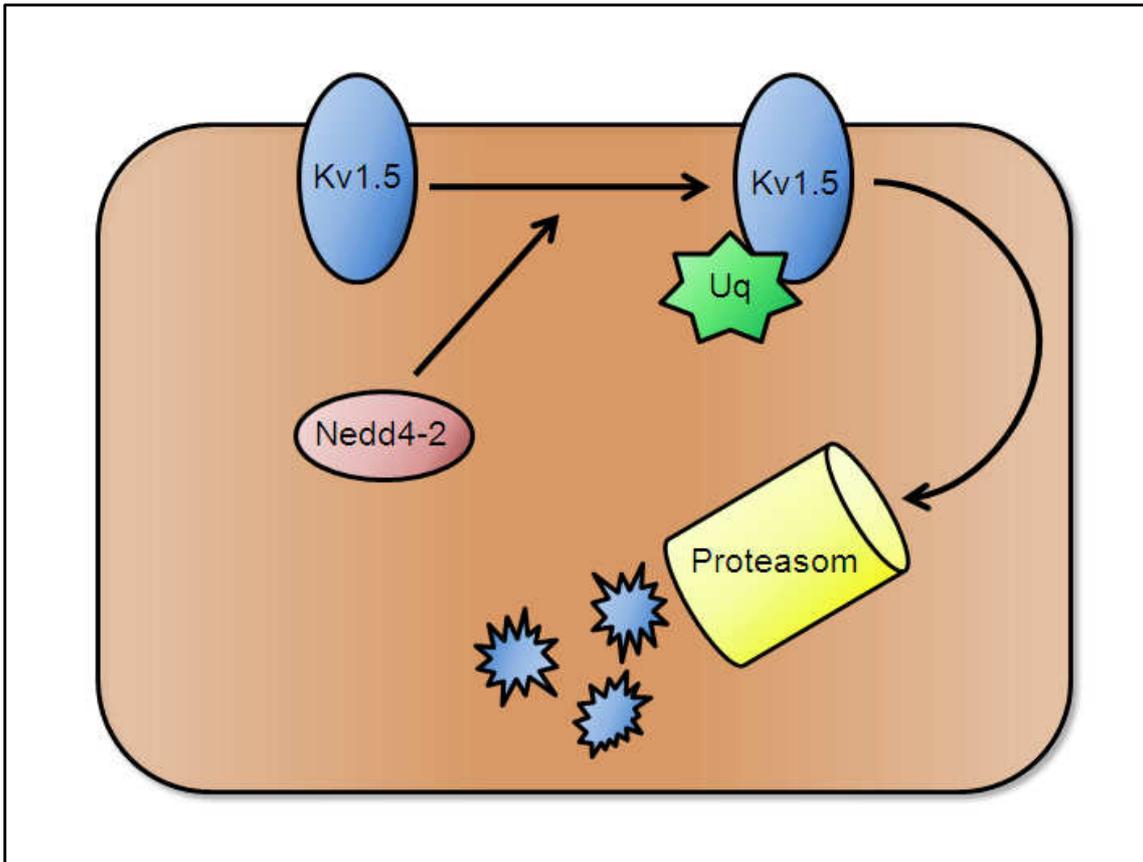
### **4.3 Molekulare Mechanismen der Stimulation durch SGK1**

Dieser Teil der Arbeit zielt darauf ab, den Signaltransduktionsprozess und die molekularen Mechanismen der Stimulation des  $K_V1.5$  durch die Serum- und Glukokortikoid-induzierbare Kinase (SGK1) genauer zu betrachten. Bis dato wurde in der Literatur über verschiedene Mechanismen berichtet, wie die Kinase auf die Funktion von Ionenkanälen und Membrantransportern Einfluss nehmen kann. Die SGK1 kann ihre Zielproteine durch direkte Phosphorylierung (116) oder durch Phosphorylierung der Ubiquitinligase Nedd4-2, die ihrerseits ihre Zielproteine ubiquitiniert und sie dem Proteasom zuführt, stimulieren (16, 42, 46, 51, 109).

$K_V1.5$  besitzt, wie oben bereits kurz erwähnt, vier mögliche SGK1 Konsensussequenzen, die bei den unterschiedlichsten Spezies höchst konserviert vorliegen. Diese starke Konservierung legt die Vermutung nahe, dass diese Sequenzen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Kanals durch die Kinase spielen. Jedoch beweisen die Experimente, dass die SGK1 trotz ausgeschalteter Konsensussequenzen noch immer einen Effekt auf den  $K_V1.5$

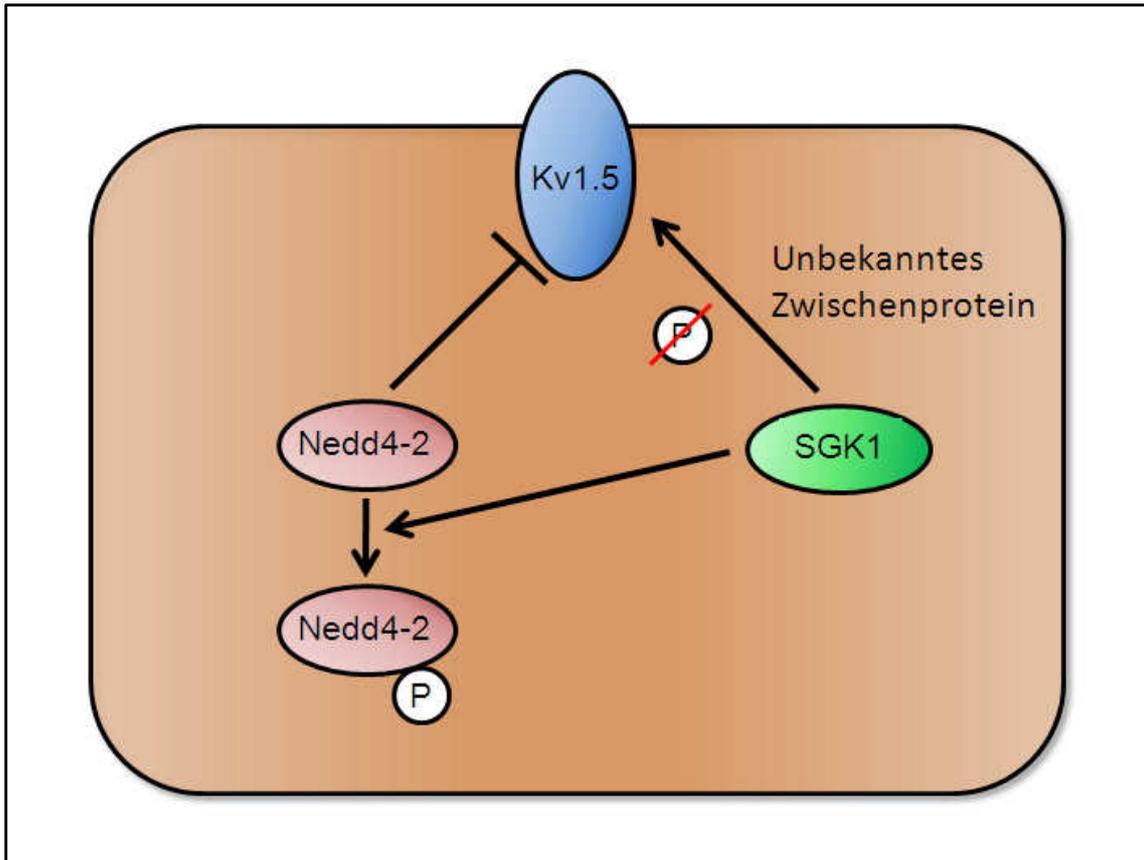
hat (siehe Abbildung 38). Es gibt aber Kinasen, die  $K_V1.5$  durch Phosphorylierung modulieren können. Ähnlich wie die SGK1, kann die Proteinkinase A (PKA) den  $K_V1.5$  regulieren (3, 34, 99, 100). Wie die SGK1 wirkt die PKA jedoch nur indirekt auf den Kanal, da gezeigt wurde, dass eine pharmakologische Inhibition der Kinase den Strom einer  $K_V1.5$  Mutante ohne C-terminale PKA Phosphorylierungsstelle nicht reduziert. Um den Kanal regulieren zu können, benötigt die Kinase ein intaktes Aktincytoskelett und  $\alpha$ -Aktinin-2 (99). Die PKA stimuliert den  $K_V1.5$ , indem sie die Inaktivierung des Kanals verlangsamt. Dies kann sie aber nur, wenn der Kanal mit der  $K_V$ -Untereinheit,  $K_V\beta1.3$  koexprimiert wird. Die Kinase phosphoryliert die Untereinheit im Bereich der PKA Konsensussequenz am N-Terminus der  $K_V\beta1.3$  (91). Dieser Mechanismus erscheint jedoch für die SGK1 als sehr unwahrscheinlich, da die  $K_V\beta1.3$ -Untereinheit keine SGK1 Konsensussequenz trägt.

Wie bereits oben erwähnt, kann die SGK1 die Proteinexpression in der Plasmamembran durch die Phosphorylierung der Ubiquitinligase Nedd4-2 regulieren (42). Es liegen bis dato viele Studien vor, die die Ubiquitinierung als einen Regulationsmechanismus zur Expression von cytosolischen Proteinen enthüllt haben (45). Zudem dient die Ubiquitinierung dem Abbau von fehlgefalteten oder falsch zusammengesetzten Proteinkomplexen. Genauso können auch Membranproteine und Ionenkanäle den Prozess der Ubiquitinierung durchlaufen und so für die Internalisierung markiert werden. Nach Markierung durch Ubiquitin werden sie dann dem endosomalen oder lysosomalen Weg zugeführt (71). So identifizierte kürzlich eine Studie den membranständigen Epithelialen  $Na^+$ -Kanal (ENaC) als ein Ziel der Ubiquitinierung durch die Nedd4-2 (159). Dabei reduziert Nedd4-2 nur die Expression des ENaC in der Plasmamembran, die Menge an cytosolischem ENaC blieb unverändert. Jetzt kann in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Ubiquitinligase Nedd4-2 den  $K_V1.5$  durch die Ubiquitinierung des membranständigen  $K_V1.5$  und die dann folgende Degradierung und Verminderung der Membranexpression inhibiert (siehe Abbildung 41Abbildung 45).



**Abbildung 54: Schematische Darstellung der Interaktion der Nedd4-2 und des Kv1.5.** Die Ubiquitinligase Nedd4-2 führt zur Ubiquitinierung des Kv1.5. Nachfolgend wird der mit Ubiquitin markierte Kv1.5 zur Degradation dem Proteasom zugeführt.

Die Ubiquitinierung des Kv1.5 war zwar schon zuvor beschrieben worden (84), jedoch war das zuständige Enzym noch unbekannt. Zudem zeigt sich, dass die Nedd4-2 ihrerseits durch die SGK1 phosphoryliert und dadurch inhibiert wird (siehe Abbildung 46). Die Hemmung der Inhibition durch die Nedd4-2 führt zu einer Stimulation durch die SGK1.



**Abbildung 55: Schematische Darstellung der Interaktion der SGK1 mit der Nedd4-2 und dem Kv1.5.** Die SGK1 phosphoryliert und mindert dadurch die Aktivität der Nedd4-2. Die aktive Nedd4-2 inhibiert den Kv1.5. Zusätzlich zur Hemmung der Nedd4-2 ist wahrscheinlich, dass die SGK1 über ein bis dato unbekanntes Zwischenprotein auf den Kv1.5 wirkt, eine direkte Phosphorylierung des Kv1.5 liegt nicht vor.

Die Inhibition durch die Nedd4-2 zeigt sich allerdings stärker als die Stimulation durch die SGK1 (siehe Abbildung 46). Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, dass die Aktivität der endogen exprimierten Nedd4-2 gering sein könnte und außerdem könnte die exogen zugeführte SGK1 weniger effektiv sein als der Effekt der exogenen Nedd4-2. Wie in Abbildung 46 gezeigt, führt die SGK1 in steigenden Konzentrationen zu einer stufenweisen Abnahme des Effektes der Nedd4-2 auf den Kv1.5. Diese Art des Wirkmechanismus der SGK1 auf den Kv1.5 ist auch bei anderen Ionenkanälen bekannt, so auch bei dem Epithelialen Na<sup>+</sup>-Kanal (42) und den Cl<sup>-</sup>-Kanälen ClCKa/Barttin und CLC-2 (51, 108).

Schlussfolgernd lässt sich über diesen Teil der Arbeit sagen, dass die SGK1 die Aktivität und Expression des Kv1.5 durch eine Hemmung der Ubiquitinierung

durch die Nedd4-2 moduliert. Das führt zur Stabilisierung in der Plasmamembran. Die Ubiquitinierung ist eine neue Form der posttranslationalen Modifikation des K<sub>V</sub>1.5 neben der Phosphorylierung, Glykosylierung und S-Acetylierung, die alle der Regulation der Funktion und/oder der Membranexpression des Kanals dienen.

## 5 Zusammenfassung

Der Kaliumkanal  $K_{V1.5}$  gehört zur Familie der spannungsabhängigen Kaliumkanäle ( $K_V$ ). Der Kanal verfügt über ein N-terminales und ein C-terminales PDZ-Bindemotiv, das durch Proteine erkannt werden könnte, die ihrerseits über eine PDZ-Domäne verfügen, wie die Gerüstproteine NHERF1 und NHERF2. Die Serum- und Glukokortikoid-induzierbare Kinase (SGK1) spielt bei der verminderten Insulinsekretion bei Dexamethasongabe durch die Regulation von spannungsabhängigen Kaliumkanälen eine Rolle. Die SGK1 nimmt direkten Einfluss auf den  $K_{V1.5}$ , jedoch war der genaue Mechanismus bisher unbekannt. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob und wie die NHERF Isoformen auf  $K_{V1.5}$  wirken und wie der Signaltransduktionsprozess der SGK1 auf den  $K_{V1.5}$  vonstatten geht. Elektrophysiologische Untersuchungen am *Xenopus laevis* Modell zeigten, dass sowohl NHERF1 als auch NHERF2 den  $K_{V1.5}$  stimulieren können und dass dazu ein intaktes C-terminales PDZ-Bindemotiv des  $K_{V1.5}$  von Nöten ist. NHERF2 erhöht die Expression des Kanals in der Plasmamembran durch verminderte Internalisierung, wie dies durch Experimente mit Brefeldin A gezeigt werden konnte. Die Stimulation durch die SGK1, die bekannterweise mit ihrer zweiten PDZ-Domäne mit NHERF2 interagiert, wird durch die zusätzliche Expression des NHERF2 noch weiter gesteigert. Diese weitere Steigerung zeigte sich nicht mehr, wenn die zweite PDZ-Domäne des NHERF2 gestört wird. Die Effekte der NHERF-Proteine sind spezifisch für  $K_{V1.5}$ , da Experimente mit dem nahen Verwandten  $K_{V1.3}$  keine Stimulation erbringen. Experimente zum Signaltransduktionsprozess der SGK1 zeigen, dass die SGK1 mit der Ubiquitinligase Nedd4-2 interferiert und so die Ubiquitinierung des Kanals hemmt. Bei Koexpression des Kanals mit der Ubiquitinligase Nedd4-2 zeigen sich stark verringerte Ströme in der Voltage-Clamp-Messung. Die SGK1 ist in der Lage zumindest teilweise diese Hemmung zu kompensieren. Es zeigt sich eine durch die SGK1 hervorgerufene Steigerung der Expression des  $K_{V1.5}$  in der Plasmamembran durch verringerte Degradation des Kanals.

Zum Schluss lässt sich sagen, dass die NHERF-Proteine an der Regulation der elektrischen Erregbarkeit von Zellen mitwirken, indem sie die Membranexpression des  $K_V1.5$  kontrollieren und Moleküle, die am Signaltransduktionsprozess teilnehmen in die Nähe des Kanals bringen. Die SGK1 stimuliert den  $K_V1.5$  durch eine Inhibition der Ubiquitinierung durch die Nedd4-2, was zu einer Stabilisierung in der Plasmamembran führt. Die Kinase könnte dadurch teilweise an der Regulation der Insulinsekretion durch Kontrolle des  $K_V1.5$  eine Rolle spielen.

## 6 Literatur

### 6.1 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
as	Antisense
CFTR	Cystic fibrosis transmembran conductance regulator
cRNA	komplementäre RNA (engl. Complementary RNA)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. Deoxyribonucleic acid)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERM	Ezrin, Radixin, Moesin, Merlin
M	Mol
min	Minuten
n.i.	nicht injiziert
NP-40	Nonoxynol-40
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PDK1	PI3-Kinase abhängige Kinase 1 (engl. PI3-Kinase dependent Kinase 1)
PDK2	PI3-Kinase abhängige Kinase 2 (engl. PI3-Kinase dependent Kinase 2)
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol 3 - Kinase
RNA	Ribonukleinsäure (engl. Ribonucleic acid)
rNTPS	Ribonukleosidtriphosphat
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. Rounds per minute)
s	Sense
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (engl. Standard error means)
SGK	Serum- und Glukokortikoid induzierbare Kinase
T1	Tetramerisation 1
V	Volt
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

## 6.2 Publikationsverzeichnis

1. **Alesutan IS, Ureche ON, Laufer J, Klaus F, Zürn A, Lindner R, Strutz-Seebohm N, Tavaré JM, Boehmer C, Palmada M, Lang UE, Seebohm G, Lang F.** Regulation of the glutamate transporter EAAT4 by PIKfyve. *Cell Physiol Biochem* 25: 187-194, 2010.
2. **Boehmer C, Laufer J, Jeyaraj S, Klaus F, Lindner R, Lang F, and Palmada M.** Modulation of the voltage-gated potassium channel Kv1.5 by the SGK1 protein kinase involves inhibition of channel ubiquitination. *Cell Physiol Biochem* 22: 591-600, 2008.
3. **Boehmer C, Palmada M, Kenngott C, Lindner R, Klaus F, Laufer J, and Lang F.** Regulation of the epithelial calcium channel TRPV6 by the serum and glucocorticoid-inducible kinase isoforms SGK1 and SGK3. *FEBS Lett* 581: 5586-5590, 2007.
4. **Boehmer C, Palmada M, Klaus F, Jeyaraj S, Lindner R, Laufer J, Daniel H, and Lang F.** The peptide transporter PEPT2 is targeted by the protein kinase SGK1 and the scaffold protein NHERF2. *Cell Physiol Biochem* 22: 705-714, 2008.
5. **Boehmer C, Sopjani M, Klaus F, Lindner R, Laufer J, Jeyaraj S, Lang F, Palmada M.** The serum und glucocorticoid inducible kinases SGK1-3 stimulate the neutral amino acid transporter SLC6A19. *Cell Physiol Biochem* 25: 723-732, 2010
6. **Gehring EM, Zurn A, Klaus F, Laufer J, Sopjani M, Lindner R, Strutz-Seebohm N, Tavaré JM, Boehmer C, Palmada M, Lang UE, Seebohm G, Lang F.** Regulation of the glutamate transporter EAAT2 by PIKfyve. *Cell Physiol Biochem* 24: 361-368, 2009.
7. **Klaus F, Gehring E, Zuern A, Laufer J, Lindner R, Strutz-Seebohm N, Taware J, Rothstein J, Boehmer C, Palmada M, Gruner I, Lang U, Seebohm G, Lang F.** Regulation of the Na<sup>+</sup>-coupled glutamate transporter EAAT3 by PIKfyve. *Neurochem Int* 54: 372-377, 2009.
8. **Klaus F, Laufer J, Czarkowski K, Strutz-Seebohm N, Seebohm G, and Lang F.** PIKfyve-dependent regulation of the Cl(-) channel ClC-2. *Biochem Biophys Res Commun* 381: 407-411, 2009.
9. **Klaus F, Palmada M, Lindner R, Laufer J, Jeyaraj S, Lang F, and Boehmer C.** Up-regulation of hypertonicity-activated myo-inositol transporter SMIT1 by the cell volume-sensitive protein kinase SGK1. *J Physiol* 586: 1539-1547, 2008.

10. **Laufer J, Boehmer C, Jeyaraj S, Knuwer M, Klaus F, Lindner R, Palmada M, and Lang F.** The C-terminal PDZ-binding motif in the Kv1.5 potassium channel governs its modulation by the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor 2. *Cell Physiol Biochem* 23: 25-36, 2009.
11. **Sopjani M, Kunert A, Czarkowski K, Klaus F, Laufer J, Föller M, Lang F.** Regulation of the Ca<sup>2+</sup> channel TRPV6 by the kinases SGK1, PBK/AKT and PIKfyve. *J Membr Biol* 233: 35-41, 2010.

### 6.3 Literaturverzeichnis

1. **Abriel H, Loffing J, Rebhun JF, Pratt JH, Schild L, Horisberger JD, Rotin D, and Staub O.** Defective regulation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel by Nedd4 in Liddle's syndrome. *J Clin Invest* 103: 667-673, 1999.
2. **Adda S, Fleischmann BK, Freedman BD, Yu M, Hay DW, and Kotlikoff MI.** Expression and function of voltage-dependent potassium channel genes in human airway smooth muscle. *J Biol Chem* 271: 13239-13243, 1996.
3. **Aiello EA, Walsh MP, and Cole WC.** Phosphorylation by protein kinase A enhances delayed rectifier K<sup>+</sup> current in rabbit vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 268: H926-934, 1995.
4. **Akutsu N, Lin R, Bastien Y, Bestawros A, Enepekides DJ, Black MJ, and White JH.** Regulation of gene Expression by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 and Its analog EB1089 under growth-inhibitory conditions in squamous carcinoma Cells. *Mol Endocrinol* 15: 1127-1139, 2001.
5. **Alliston TN, Gonzalez-Robayna IJ, Buse P, Firestone GL, and Richards JS.** Expression and localization of serum/glucocorticoid-induced kinase in the rat ovary: relation to follicular growth and differentiation. *Endocrinology* 141: 385-395, 2000.
6. **Anan T, Nagata Y, Koga H, Honda Y, Yabuki N, Miyamoto C, Kuwano A, Matsuda I, Endo F, Saya H, and Nakao M.** Human ubiquitin-protein ligase Nedd4: expression, subcellular localization and selective interaction with ubiquitin-conjugating enzymes. *Genes Cells* 3: 751-763, 1998.
7. **Archer SL, London B, Hampl V, Wu X, Nsair A, Puttagunta L, Hashimoto K, Waite RE, and Michelakis ED.** Impairment of hypoxic pulmonary vasoconstriction in mice lacking the voltage-gated potassium channel Kv1.5. *FASEB J* 15: 1801-1803, 2001.

8. **Asher C, Sinha I, and Garty H.** Characterization of the interactions between Nedd4-2, ENaC, and sgk-1 using surface plasmon resonance. *Biochim Biophys Acta* 1612: 59-64, 2003.
9. **Bagowski CP, Myers JW, and Ferrell JE, Jr.** The classical progesterone receptor associates with p42 MAPK and is involved in phosphatidylinositol 3-kinase signaling in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 276: 37708-37714, 2001.
10. **Benson MD, Li QJ, Kieckhafer K, Dudek D, Whorton MR, Sunahara RK, Iniguez-Lluhi JA, and Martens JR.** SUMO modification regulates inactivation of the voltage-gated potassium channel Kv1.5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 1805-1810, 2007.
11. **Bezanilla F.** Voltage-gated ion channels. *IEEE Trans Nanobioscience* 4: 34-48, 2005.
12. **Bhargava A, Fullerton MJ, Myles K, Purdy TM, Funder JW, Pearce D, and Cole TJ.** The serum- and glucocorticoid-induced kinase is a physiological mediator of aldosterone action. *Endocrinology* 142: 1587-1594, 2001.
13. **Boehmer C, Embark HM, Bauer A, Palmada M, Yun CH, Weinman EJ, Endou H, Cohen P, Lahme S, Bichler KH, and Lang F.** Stimulation of renal Na<sup>+</sup> dicarboxylate cotransporter 1 by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulating factor 2, serum and glucocorticoid inducible kinase isoforms, and protein kinase B. *Biochem Biophys Res Commun* 313: 998-1003, 2004.
14. **Boehmer C, Henke G, Schniepp R, Palmada M, Rothstein JD, Broer S, and Lang F.** Regulation of the glutamate transporter EAAT1 by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and the serum and glucocorticoid-inducible kinase isoforms SGK1/3 and protein kinase B. *J Neurochem* 86: 1181-1188, 2003.
15. **Boehmer C, Laufer J, Jeyaraj S, Klaus F, Lindner R, Lang F, and Palmada M.** Modulation of the voltage-gated potassium channel Kv1.5 by the SGK1 protein kinase involves inhibition of channel ubiquitination. *Cell Physiol Biochem* 22: 591-600, 2008.
16. **Boehmer C, Palmada M, Rajamanickam J, Schniepp R, Amara S, and Lang F.** Post-translational regulation of EAAT2 function by co-expressed ubiquitin ligase Nedd4-2 is impacted by SGK kinases. *J Neurochem* 97: 911-921, 2006.
17. **Boehmer C, Philippin M, Rajamanickam J, Mack A, Broer S, Palmada M, and Lang F.** Stimulation of the EAAT4 glutamate transporter by SGK protein kinase isoforms and PKB. *Biochem Biophys Res Commun* 324: 1242-1248, 2004.

18. **Brennan FE, and Fuller PJ.** Rapid upregulation of serum and glucocorticoid-regulated kinase (sgk) gene expression by corticosteroids in vivo. *Mol Cell Endocrinol* 166: 129-136, 2000.
19. **Brunet A, Park J, Tran H, Hu LS, Hemmings BA, and Greenberg ME.** Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a). *Mol Cell Biol* 21: 952-965, 2001.
20. **Brunner M, Kodirov SA, Mitchell GF, Buckett PD, Shibata K, Folco EJ, Baker L, Salama G, Chan DP, Zhou J, and Koren G.** In vivo gene transfer of Kv1.5 normalizes action potential duration and shortens QT interval in mice with long QT phenotype. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H194-203, 2003.
21. **Buse P, Tran SH, Luther E, Phu PT, Aponte GW, and Firestone GL.** Cell cycle and hormonal control of nuclear-cytoplasmic localization of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase, Sgk, in mammary tumor cells. A novel convergence point of anti-proliferative and proliferative cell signaling pathways. *J Biol Chem* 274: 7253-7263, 1999.
22. **Busjahn A, Aydin A, Uhlmann R, Krasko C, Bahring S, Szelestei T, Feng Y, Dahm S, Sharma AM, Luft FC, and Lang F.** Serum- and glucocorticoid-regulated kinase (SGK1) gene and blood pressure. *Hypertension* 40: 256-260, 2002.
23. **Busjahn A, and Luft FC.** Twin studies in the analysis of minor physiological differences between individuals. *Cell Physiol Biochem* 13: 51-58, 2003.
24. **Busjahn A, Seebohm G, Maier G, Toliat MR, Nurnberg P, Aydin A, Luft FC, and Lang F.** Association of the serum and glucocorticoid regulated kinase (sgk1) gene with QT interval. *Cell Physiol Biochem* 14: 135-142, 2004.
25. **Cao TT, Deacon HW, Reczek D, Bretscher A, and von Zastrow M.** A kinase-regulated PDZ-domain interaction controls endocytic sorting of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 401: 286-290, 1999.
26. **Caplan MJ.** Membrane polarity in epithelial cells: protein sorting and establishment of polarized domains. *Am J Physiol* 272: F425-429, 1997.
27. **Casamayor A, Torrance PD, Kobayashi T, Thorner J, and Alessi DR.** Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast. *Curr Biol* 9: 186-197, 1999.
28. **Chen SY, Bhargava A, Mastroberardino L, Meijer OC, Wang J, Buse P, Firestone GL, Verrey F, and Pearce D.** Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2514-2519, 1999.

29. **Chu S, Rushdi S, Zumpe ET, Mamers P, Healy DL, Jobling T, Burger HG, and Fuller PJ.** FSH-regulated gene expression profiles in ovarian tumours and normal ovaries. *Mol Hum Reprod* 8: 426-433, 2002.
30. **Chun J, Kwon T, Lee E, Suh PG, Choi EJ, and Sun Kang S.** The Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor 2 mediates phosphorylation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1. *Biochem Biophys Res Commun* 298: 207-215, 2002.
31. **Chung EJ, Sung YK, Farooq M, Kim Y, Im S, Tak WY, Hwang YJ, Kim YI, Han HS, Kim JC, and Kim MK.** Gene expression profile analysis in human hepatocellular carcinoma by cDNA microarray. *Mol Cells* 14: 382-387, 2002.
32. **Ciechanover A.** The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* 79: 13-21, 1994.
33. **Cobb J, and Duboule D.** Comparative analysis of genes downstream of the Hoxd cluster in developing digits and external genitalia. *Development* 132: 3055-3067, 2005.
34. **Cole WC, Clement-Chomienne O, and Aiello EA.** Regulation of 4-aminopyridine-sensitive, delayed rectifier K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle by phosphorylation. *Biochem Cell Biol* 74: 439-447, 1996.
35. **Cooper MS, Bujalska I, Rabbitt E, Walker EA, Bland R, Sheppard MC, Hewison M, and Stewart PM.** Modulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase isozymes by proinflammatory cytokines in osteoblasts: an autocrine switch from glucocorticoid inactivation to activation. *J Bone Miner Res* 16: 1037-1044, 2001.
36. **Cowling RT, and Birnboim HC.** Expression of serum- and glucocorticoid-regulated kinase (sgk) mRNA is up-regulated by GM-CSF and other proinflammatory mediators in human granulocytes. *J Leukoc Biol* 67: 240-248, 2000.
37. **Cukovic D, Lu GW, Wible B, Steele DF, and Fedida D.** A discrete amino terminal domain of Kv1.5 and Kv1.4 potassium channels interacts with the spectrin repeats of alpha-actinin-2. *FEBS Lett* 498: 87-92, 2001.
38. **Cuppen E, Gerrits H, Pepers B, Wieringa B, and Hendriks W.** PDZ motifs in PTP-BL and RIL bind to internal protein segments in the LIM domain protein RIL. *Mol Biol Cell* 9: 671-683, 1998.
39. **Cushman SJ, Nanao MH, Jahng AW, DeRubeis D, Choe S, and Pfaffinger PJ.** Voltage dependent activation of potassium channels is coupled to T1 domain structure. *Nat Struct Biol* 7: 403-407, 2000.
40. **Dascal N.** The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit Rev Biochem* 22: 317-387, 1987.

41. **David S, and Kalb RG.** Serum/glucocorticoid-inducible kinase can phosphorylate the cyclic AMP response element binding protein, CREB. *FEBS Lett* 579: 1534-1538, 2005.
42. **Debonneville C, Flores SY, Kamynina E, Plant PJ, Tauxe C, Thomas MA, Munster C, Chraibi A, Pratt JH, Horisberger JD, Pearce D, Loffing J, and Staub O.** Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na(+) channel cell surface expression. *EMBO J* 20: 7052-7059, 2001.
43. **deHart AK, Schnell JD, Allen DA, and Hicke L.** The conserved Pkh-Ypk kinase cascade is required for endocytosis in yeast. *J Cell Biol* 156: 241-248, 2002.
44. **Delaunay F, Khan A, Cintra A, Davani B, Ling ZC, Andersson A, Ostenson CG, Gustafsson J, Efendic S, and Okret S.** Pancreatic beta cells are important targets for the diabetogenic effects of glucocorticoids. *J Clin Invest* 100: 2094-2098, 1997.
45. **Deshaies RJ.** Make it or break it: the role of ubiquitin-dependent proteolysis in cellular regulation. *Trends Cell Biol* 5: 428-434, 1995.
46. **Dieter M, Palmada M, Rajamanickam J, Aydin A, Busjahn A, Boehmer C, Luft FC, and Lang F.** Regulation of glucose transporter SGLT1 by ubiquitin ligase Nedd4-2 and kinases SGK1, SGK3, and PKB. *Obes Res* 12: 862-870, 2004.
47. **Dumont JN, and Brummett AR.** Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). V. Relationships between developing oocytes and their investing follicular tissues. *J Morphol* 155: 73-97, 1978.
48. **Ehrlich JR, Nattel S, and Hohnloser SH.** Novel anti-arrhythmic drugs for atrial fibrillation management. *Curr Vasc Pharmacol* 5: 185-195, 2007.
49. **Eldstrom J, Choi WS, Steele DF, and Fedida D.** SAP97 increases Kv1.5 currents through an indirect N-terminal mechanism. *FEBS Lett* 547: 205-211, 2003.
50. **Eldstrom J, Doerksen KW, Steele DF, and Fedida D.** N-terminal PDZ-binding domain in Kv1 potassium channels. *FEBS Lett* 531: 529-537, 2002.
51. **Embark HM, Bohmer C, Palmada M, Rajamanickam J, Wyatt AW, Wallisch S, Capasso G, Waldegger P, Seyberth HW, Waldegger S, and Lang F.** Regulation of CLC-Ka/barttin by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and the serum- and glucocorticoid-dependent kinases. *Kidney Int* 66: 1918-1925, 2004.
52. **Embark HM, Setiawan I, Poppendieck S, van de Graaf SF, Boehmer C, Palmada M, Wieder T, Gerstberger R, Cohen P, Yun CC, Bindels RJ, and**

**Lang F.** Regulation of the epithelial Ca<sup>2+</sup> channel TRPV5 by the NHE regulating factor NHERF2 and the serum and glucocorticoid inducible kinase isoforms SGK1 and SGK3 expressed in *Xenopus oocytes*. *Cell Physiol Biochem* 14: 203-212, 2004.

53. **Fanger CM, Ghanshani S, Logsdon NJ, Rauer H, Kalman K, Zhou J, Beckingham K, Chandy KG, Cahalan MD, and Aiyar J.** Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance KCa channel, IKCa1. *J Biol Chem* 274: 5746-5754, 1999.

54. **Fanning AS, and Anderson JM.** PDZ domains: fundamental building blocks in the organization of protein complexes at the plasma membrane. *J Clin Invest* 103: 767-772, 1999.

55. **Farr TJ, Coddington-Lawson SJ, Snyder PM, and McDonald FJ.** Human Nedd4 interacts with the human epithelial Na<sup>+</sup> channel: WW3 but not WW1 binds to Na<sup>+</sup>-channel subunits. *Biochem J* 345 Pt 3: 503-509, 2000.

56. **Fedida D, Eldstrom J, Hesketh JC, Lamorgese M, Castel L, Steele DF, and Van Wagoner DR.** Kv1.5 is an important component of repolarizing K<sup>+</sup> current in canine atrial myocytes. *Circ Res* 93: 744-751, 2003.

57. **Fillon S, Klingel K, Warntges S, Sauter M, Gabrysch S, Pestel S, Tanneur V, Waldegger S, Zipfel A, Viebahn R, Haussinger D, Broer S, Kandolf R, and Lang F.** Expression of the serine/threonine kinase hSGK1 in chronic viral hepatitis. *Cell Physiol Biochem* 12: 47-54, 2002.

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

59. **Friedrich B, Warntges S, Klingel K, Sauter M, Kandolf R, Risler T, Muller GA, Witzgall R, Kriz W, Grone HJ, and Lang F.** Up-regulation of the human serum and glucocorticoid-dependent kinase 1 in glomerulonephritis. *Kidney Blood Press Res* 25: 303-307, 2002.

60. **Gaborit N, Le Bouter S, Szuts V, Varro A, Escande D, Nattel S, and Demolombe S.** Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *J Physiol* 582: 675-693, 2007.

61. **Goldstein SA, Bockenhauer D, O'Kelly I, and Zilberberg N.** Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. *Nat Rev Neurosci* 2: 175-184, 2001.

62. **Goldstein SA, Price LA, Rosenthal DN, and Pausch MH.** ORK1, a potassium-selective leak channel with two pore domains cloned from

*Drosophila melanogaster* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13256-13261, 1996.

63. **Gonzalez-Nicolini V, and McGinty JF.** Gene expression profile from the striatum of amphetamine-treated rats: a cDNA array and in situ hybridization histochemical study. *Brain Res Gene Expr Patterns* 1: 193-198, 2002.

64. **Gubitosi-Klug RA, Mancuso DJ, and Gross RW.** The human Kv1.1 channel is palmitoylated, modulating voltage sensing: Identification of a palmitoylation consensus sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 5964-5968, 2005.

65. **Gutman GA, Chandy KG, Adelman JP, Aiyar J, Bayliss DA, Clapham DE, Covarriubias M, Desir GV, Furuichi K, Ganetzky B, Garcia ML, Grissmer S, Jan LY, Karschin A, Kim D, Kuperschmidt S, Kurachi Y, Lazdunski M, Lesage F, Lester HA, McKinnon D, Nichols CG, O'Kelly I, Robbins J, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti M, Seino S, Stuehmer W, Tamkun MM, Vandenberg CA, Wei A, Wulff H, and Wymore RS.** International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol Rev* 55: 583-586, 2003.

66. **Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stuehmer W, and Wang X.** International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 57: 473-508, 2005.

67. **Hall RA, Ostedgaard LS, Premont RT, Blitzer JT, Rahman N, Welsh MJ, and Lefkowitz RJ.** A C-terminal motif found in the beta2-adrenergic receptor, P2Y1 receptor and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator determines binding to the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor family of PDZ proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 8496-8501, 1998.

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

69. **Hertweck M, Gobel C, and Baumeister R.** *C. elegans* SGK-1 is the critical component in the Akt/PKB kinase complex to control stress response and life span. *Dev Cell* 6: 577-588, 2004.

70. **Hillier BJ, Christopherson KS, Prehoda KE, Bretz DS, and Lim WA.** Unexpected modes of PDZ domain scaffolding revealed by structure of nNOS-syntrophin complex. *Science* 284: 812-815, 1999.

71. **Hochstrasser M.** Protein degradation or regulation: Ub the judge. *Cell* 84: 813-815, 1996.

72. **Hodgkin AL, and Huxley AF.** A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 117: 500-544, 1952.
73. **Huber SM, Friedrich B, Klingel K, Lenka N, Hescheler J, and Lang F.** Protein and mRNA expression of serum and glucocorticoid-dependent kinase 1 in metanephrogenesis. *Dev Dyn* 221: 464-469, 2001.
74. **Huibregtse JM, Scheffner M, Beaudenon S, and Howley PM.** A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 2563-2567, 1995.
75. **Huibregtse JM, Scheffner M, and Howley PM.** Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol Cell Biol* 13: 775-784, 1993.
76. **Ishii TM, Silvia C, Hirschberg B, Bond CT, Adelman JP, and Maylie J.** A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 11651-11656, 1997.
77. **Jentsch S.** The ubiquitin-conjugation system. *Annu Rev Genet* 26: 179-207, 1992.
78. **Jerng HH, Pfaffinger PJ, and Covarrubias M.** Molecular physiology and modulation of somatodendritic A-type potassium channels. *Mol Cell Neurosci* 27: 343-369, 2004.
79. **Jeyaraj S.** Die Rolle der Serum- und Glukokortikoid-induzierbaren Kinase SGK1 in der Regulation des Glukosetransports. In: *Fakultät für Biologie*. Tübingen: Eberhard Karls Universität Tübingen, 2007.
80. **Joiner WJ, Wang LY, Tang MD, and Kaczmarek LK.** hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 11013-11018, 1997.
81. **Jolliffe CN, Harvey KF, Haines BP, Parasivam G, and Kumar S.** Identification of multiple proteins expressed in murine embryos as binding partners for the WW domains of the ubiquitin-protein ligase Nedd4. *Biochem J* 351 Pt 3: 557-565, 2000.
82. **Kamynina E, Debonneville C, Bens M, Vandewalle A, and Staub O.** A novel mouse Nedd4 protein suppresses the activity of the epithelial Na<sup>+</sup> channel. *FASEB J* 15: 204-214, 2001.
83. **Kanelis V, Rotin D, and Forman-Kay JD.** Solution structure of a Nedd4 WW domain-ENaC peptide complex. *Nat Struct Biol* 8: 407-412, 2001.

84. **Kato M, Ogura K, Miake J, Sasaki N, Taniguchi S, Igawa O, Yoshida A, Hoshikawa Y, Murata M, Nanba E, Kurata Y, Kawata Y, Ninomiya H, Morisaki T, Kitakaze M, and Hisatome I.** Evidence for proteasomal degradation of Kv1.5 channel protein. *Biochem Biophys Res Commun* 337: 343-348, 2005.
85. **Ketchum KA, Joiner WJ, Sellers AJ, Kaczmarek LK, and Goldstein SA.** A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* 376: 690-695, 1995.
86. **Klingel K, Warntges S, Bock J, Wagner CA, Sauter M, Waldegger S, Kandolf R, and Lang F.** Expression of cell volume-regulated kinase h-sgk in pancreatic tissue. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279: G998-G1002, 2000.
87. **Kobayashi T, and Cohen P.** Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositide 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2. *Biochem J* 339 ( Pt 2): 319-328, 1999.
88. **Kobayashi T, Deak M, Morrice N, and Cohen P.** Characterization of the structure and regulation of two novel isoforms of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase. *Biochem J* 344 Pt 1: 189-197, 1999.
89. **Kubo Y, Adelman JP, Clapham DE, Jan LY, Karschin A, Kurachi Y, Lazdunski M, Nichols CG, Seino S, and Vandenberg CA.** International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev* 57: 509-526, 2005.
90. **Kumar S, Tomooka Y, and Noda M.** Identification of a set of genes with developmentally down-regulated expression in the mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun* 185: 1155-1161, 1992.
91. **Kwak YG, Hu N, Wei J, George AL, Jr., Grobaski TD, Tamkun MM, and Murray KT.** Protein kinase A phosphorylation alters K $\beta$ 1.3 subunit-mediated inactivation of the Kv1.5 potassium channel. *J Biol Chem* 274: 13928-13932, 1999.
92. **Lambillotte C, Gilon P, and Henquin JC.** Direct glucocorticoid inhibition of insulin secretion. An in vitro study of dexamethasone effects in mouse islets. *J Clin Invest* 99: 414-423, 1997.
93. **Lang F, Bohmer C, Palmada M, Seebohm G, Strutz-Seebohm N, and Vallon V.** (Patho)physiological significance of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoforms. *Physiol Rev* 86: 1151-1178, 2006.
94. **Lang F, and Cohen P.** Regulation and physiological roles of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase isoforms. *Sci STKE* 2001: RE17, 2001.

95. **Laufer J, Boehmer C, Jeyaraj S, Knuwer M, Klaus F, Lindner R, Palmada M, and Lang F.** The C-terminal PDZ-binding motif in the Kv1.5 potassium channel governs its modulation by the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor 2. *Cell Physiol Biochem* 23: 25-36, 2009.
96. **MacDonald PE, Sewing S, Wang J, Joseph JW, Smukler SR, Sakellaropoulos G, Saleh MC, Chan CB, Tsushima RG, Salapatek AM, and Wheeler MB.** Inhibition of Kv2.1 voltage-dependent K<sup>+</sup> channels in pancreatic beta-cells enhances glucose-dependent insulin secretion. *J Biol Chem* 277: 44938-44945, 2002.
97. **MacDonald PE, and Wheeler MB.** Voltage-dependent K(+) channels in pancreatic beta cells: role, regulation and potential as therapeutic targets. *Diabetologia* 46: 1046-1062, 2003.
98. **Maiyar AC, Leong ML, and Firestone GL.** Importin-alpha mediates the regulated nuclear targeting of serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase (Sgk) by recognition of a nuclear localization signal in the kinase central domain. *Mol Biol Cell* 14: 1221-1239, 2003.
99. **Mason HS, Latten MJ, Godoy LD, Horowitz B, and Kenyon JL.** Modulation of Kv1.5 currents by protein kinase A, tyrosine kinase, and protein tyrosine phosphatase requires an intact cytoskeleton. *Mol Pharmacol* 61: 285-293, 2002.
100. **Mays DJ, Foose JM, Philipson LH, and Tamkun MM.** Localization of the Kv1.5 K<sup>+</sup> channel protein in explanted cardiac tissue. *J Clin Invest* 96: 282-292, 1995.
101. **McGahon MK, Dawicki JM, Arora A, Simpson DA, Gardiner TA, Stitt AW, Scholfield CN, McGeown JG, and Curtis TM.** Kv1.5 is a major component underlying the A-type potassium current in retinal arteriolar smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H1001-1008, 2007.
102. **Meng F, Yamagiwa Y, Taffetani S, Han J, and Patel T.** IL-6 activates serum and glucocorticoid kinase via p38alpha mitogen-activated protein kinase pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 289: C971-981, 2005.
103. **Moyer BD, Denton J, Karlson KH, Reynolds D, Wang S, Mickle JE, Milewski M, Cutting GR, Guggino WB, Li M, and Stanton BA.** A PDZ-interacting domain in CFTR is an apical membrane polarization signal. *J Clin Invest* 104: 1353-1361, 1999.
104. **Müller-Esterl W.** *Biochemie - Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler.* Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, 2004.
105. **Nagase T, Miyajima N, Tanaka A, Sazuka T, Seki N, Sato S, Tabata S, Ishikawa K, Kawarabayasi Y, Kotani H, and et al.** Prediction of the coding

sequences of unidentified human genes. III. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0081-KIAA0120) deduced by analysis of cDNA clones from human cell line KG-1 (supplement). *DNA Res* 2: 51-59, 1995.

106. **Nishida Y, Nagata T, Takahashi Y, Sugahara-Kobayashi M, Murata A, and Asai S.** Alteration of serum/glucocorticoid regulated kinase-1 (sgk-1) gene expression in rat hippocampus after transient global ischemia. *Brain Res Mol Brain Res* 123: 121-125, 2004.

107. **Overturf KE, Russell SN, Carl A, Vogalis F, Hart PJ, Hume JR, Sanders KM, and Horowitz B.** Cloning and characterization of a Kv1.5 delayed rectifier K<sup>+</sup> channel from vascular and visceral smooth muscles. *Am J Physiol* 267: C1231-1238, 1994.

108. **Palmada M, Dieter M, Boehmer C, Waldegger S, and Lang F.** Serum and glucocorticoid inducible kinases functionally regulate CIC-2 channels. *Biochem Biophys Res Commun* 321: 1001-1006, 2004.

109. **Palmada M, Dieter M, Speil A, Bohmer C, Mack AF, Wagner HJ, Klingel K, Kandolf R, Murer H, Biber J, Closs EI, and Lang F.** 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: G143-150, 2004.

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

111. **Palmada M, Poppendieck S, Embark HM, van de Graaf SF, Boehmer C, Bindels RJ, and Lang F.** Requirement of PDZ domains for the stimulation of the epithelial Ca<sup>2+</sup> channel TRPV5 by the NHE regulating factor NHERF2 and the serum and glucocorticoid inducible kinase SGK1. *Cell Physiol Biochem* 15: 175-182, 2005.

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

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

114. **Philipson LH, Rosenberg MP, Kuznetsov A, Lancaster ME, Worley JF, 3rd, Roe MW, and Dukes ID.** Delayed rectifier K<sup>+</sup> channel overexpression in transgenic islets and beta-cells associated with impaired glucose responsiveness. *J Biol Chem* 269: 27787-27790, 1994.

115. **Pierluissi J, Navas FO, and Ashcroft SJ.** Effect of adrenal steroids on insulin release from cultured rat islets of Langerhans. *Diabetologia* 29: 119-121, 1986.
116. **Rajamanickam J, Palmada M, Lang F, and Boehmer C.** EAAT4 phosphorylation at the SGK1 consensus site is required for transport modulation by the kinase. *J Neurochem* 102: 858-866, 2007.
117. **Rauhala HE, Porkka KP, Tolonen TT, Martikainen PM, Tammela TL, and Visakorpi T.** Dual-specificity phosphatase 1 and serum/glucocorticoid-regulated kinase are downregulated in prostate cancer. *Int J Cancer* 117: 738-745, 2005.
118. **Rauz S, Walker EA, Hughes SV, Coca-Prados M, Hewison M, Murray PI, and Stewart PM.** Serum- and glucocorticoid-regulated kinase isoform-1 and epithelial sodium channel subunits in human ocular ciliary epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 1643-1651, 2003.
119. **Rorsman P, and Renstrom E.** Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 46: 1029-1045, 2003.
120. **Roth JL, Mobarhan S, and Clohisy M.** The Metabolic Syndrome: where are we and where do we go? *Nutr Rev* 60: 335-337, 2002.
121. **Rozansky DJ, Wang J, Doan N, Purdy T, Faulk T, Bhargava A, Dawson K, and Pearce D.** Hypotonic induction of SGK1 and Na<sup>+</sup> transport in A6 cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F105-113, 2002.
122. **Sansom MS.** Potassium channels: watching a voltage-sensor tilt and twist. *Curr Biol* 10: R206-209, 2000.
123. **Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, and Howley PM.** The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75: 495-505, 1993.
124. **Schneider S, Buchert M, Georgiev O, Catimel B, Halford M, Stacker SA, Baechi T, Moelling K, and Hovens CM.** Mutagenesis and selection of PDZ domains that bind new protein targets. *Nat Biotechnol* 17: 170-175, 1999.
125. **Schniepp R, Kohler K, Ladewig T, Guenther E, Henke G, Palmada M, Boehmer C, Rothstein JD, Broer S, and Lang F.** Retinal colocalization and in vitro interaction of the glutamate transporter EAAT3 and the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 [correction]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 1442-1449, 2004.
126. **Schumacher MA, Rivard AF, Bachinger HP, and Adelman JP.** Structure of the gating domain of a Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel complexed with Ca<sup>2+</sup>/calmodulin. *Nature* 410: 1120-1124, 2001.

127. **Shelly C, and Herrera R.** Activation of SGK1 by HGF, Rac1 and integrin-mediated cell adhesion in MDCK cells: PI-3K-dependent and -independent pathways. *J Cell Sci* 115: 1985-1993, 2002.
128. **Shen NV, Chen X, Boyer MM, and Pfaffinger PJ.** Deletion analysis of K<sup>+</sup> channel assembly. *Neuron* 11: 67-76, 1993.
129. **Shenolikar S, Voltz JW, Cunningham R, and Weinman EJ.** Regulation of ion transport by the NHERF family of PDZ proteins. *Physiology (Bethesda)* 19: 362-369, 2004.
130. **Shimizu W, and Antzelevitch C.** Cellular basis for long QT, transmural dispersion of repolarization, and torsade de pointes in the long QT syndrome. *J Electrocardiol* 32 Suppl: 177-184, 1999.
131. **Short DB, Trotter KW, Reczek D, Kreda SM, Bretscher A, Boucher RC, Stutts MJ, and Milgram SL.** An apical PDZ protein anchors the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the cytoskeleton. *J Biol Chem* 273: 19797-19801, 1998.
132. **Songyang Z, Fanning AS, Fu C, Xu J, Marfatia SM, Chishti AH, Crompton A, Chan AC, Anderson JM, and Cantley LC.** Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* 275: 73-77, 1997.
133. **Soreq H.** The biosynthesis of biologically active proteins in mRNA-microinjected *Xenopus* oocytes. *CRC Crit Rev Biochem* 18: 199-238, 1985.
134. **Splawski I, Shen J, Timothy KW, Lehmann MH, Priori S, Robinson JL, Moss AJ, Schwartz PJ, Towbin JA, Vincent GM, and Keating MT.** Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation* 102: 1178-1185, 2000.
135. **Stichel CC, Schoenebeck B, Foguet M, Siebertz B, Bader V, Zhu XR, and Lubbert H.** *sgk1*, a member of an RNA cluster associated with cell death in a model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 21: 301-316, 2005.
136. **Su J, Yu H, Lenka N, Hescheler J, and Ullrich S.** The expression and regulation of depolarization-activated K<sup>+</sup> channels in the insulin-secreting cell line INS-1. *Pflugers Arch* 442: 49-56, 2001.
137. **Sun F, Hug MJ, Bradbury NA, and Frizzell RA.** Protein kinase A associates with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator via an interaction with ezrin. *J Biol Chem* 275: 14360-14366, 2000.
138. **Sun F, Hug MJ, Lewarchik CM, Yun CH, Bradbury NA, and Frizzell RA.** E3KARP mediates the association of ezrin and protein kinase A with the

cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in airway cells. *J Biol Chem* 275: 29539-29546, 2000.

139. **Tamura G, Ando K, Suzuki S, Takatsuki A, and Arima K.** Antiviral activity of brefeldin A and verrucarin A. *J Antibiot (Tokyo)* 21: 160-161, 1968.

140. **Ullrich S, Berchtold S, Ranta F, Seebohm G, Henke G, Lupescu A, Mack AF, Chao CM, Su J, Nitschke R, Alexander D, Friedrich B, Wulff P, Kuhl D, and Lang F.** Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) mediates glucocorticoid-induced inhibition of insulin secretion. *Diabetes* 54: 1090-1099, 2005.

141. **Vicente R, Escalada A, Villalonga N, Texido L, Roura-Ferrer M, Martin-Satue M, Lopez-Iglesias C, Soler C, Solsona C, Tamkun MM, and Felipe A.** Association of Kv1.5 and Kv1.3 contributes to the major voltage-dependent K<sup>+</sup> channel in macrophages. *J Biol Chem* 281: 37675-37685, 2006.

142. **Waerntges S, Klingel K, Weigert C, Fillon S, Buck M, Schleicher E, Rodemann HP, Knabbe C, Kandolf R, and Lang F.** Excessive transcription of the human serum and glucocorticoid dependent kinase hSGK1 in lung fibrosis. *Cell Physiol Biochem* 12: 135-142, 2002.

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

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

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

146. **Waldegger S, Klingel K, Barth P, Sauter M, Rfer ML, Kandolf R, and Lang F.** h-sgk serine-threonine protein kinase gene as transcriptional target of transforming growth factor beta in human intestine. *Gastroenterology* 116: 1081-1088, 1999.

147. **Wang S, Raab RW, Schatz PJ, Guggino WB, and Li M.** Peptide binding consensus of the NHE-RF-PDZ1 domain matches the C-terminal sequence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *FEBS Lett* 427: 103-108, 1998.

148. **Webster MK, Goya L, and Firestone GL.** Immediate-early transcriptional regulation and rapid mRNA turnover of a putative serine/threonine protein kinase. *J Biol Chem* 268: 11482-11485, 1993.

149. **Webster MK, Goya L, Ge Y, Maiyar AC, and Firestone GL.** Characterization of sgk, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum. *Mol Cell Biol* 13: 2031-2040, 1993.
150. **Weinman EJ, Minkoff C, and Shenolikar S.** Signal complex regulation of renal transport proteins: NHERF and regulation of NHE3 by PKA. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F393-399, 2000.
151. **Weinman EJ, Steplock D, Wang Y, and Shenolikar S.** Characterization of a protein cofactor that mediates protein kinase A regulation of the renal brush border membrane Na(+)-H+ exchanger. *J Clin Invest* 95: 2143-2149, 1995.
152. **Wu M, and Gerhart J.** Raising Xenopus in the laboratory. *Methods Cell Biol* 36: 3-18, 1991.
153. **Xia XM, Fakler B, Rivard A, Wayman G, Johnson-Pais T, Keen JE, Ishii T, Hirschberg B, Bond CT, Lutsenko S, Maylie J, and Adelman JP.** Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* 395: 503-507, 1998.
154. **Yoo D, Kim BY, Campo C, Nance L, King A, Maouyo D, and Welling PA.** Cell surface expression of the ROMK (Kir 1.1) channel is regulated by the aldosterone-induced kinase, SGK-1, and protein kinase A. *J Biol Chem* 278: 23066-23075, 2003.
155. **Yun CC, Chen Y, and Lang F.** Glucocorticoid activation of Na(+)/H(+) exchanger isoform 3 revisited. The roles of SGK1 and NHERF2. *J Biol Chem* 277: 7676-7683, 2002.
156. **Yun CC, Palmada M, Embark HM, Fedorenko O, Feng Y, Henke G, Setiawan I, Boehmer C, Weinman EJ, Sandrasagra S, Korbmacher C, Cohen P, Pearce D, and Lang F.** The serum and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 and the Na+/H+ exchange regulating factor NHERF2 synergize to stimulate the renal outer medullary K+ channel ROMK1. *J Am Soc Nephrol* 13: 2823-2830, 2002.
157. **Yun CH, Oh S, Zizak M, Steplock D, Tsao S, Tse CM, Weinman EJ, and Donowitz M.** cAMP-mediated inhibition of the epithelial brush border Na+/H+ exchanger, NHE3, requires an associated regulatory protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 3010-3015, 1997.
158. **Zhang L, Cui R, Cheng X, and Du J.** Antiapoptotic effect of serum and glucocorticoid-inducible protein kinase is mediated by novel mechanism activating I{kappa}B kinase. *Cancer Res* 65: 457-464, 2005.
159. **Zhou R, Patel SV, and Snyder PM.** Nedd4-2 catalyzes ubiquitination and degradation of cell surface ENaC. *J Biol Chem* 282: 20207-20212, 2007.

## 7 Anhang

### 7.1 Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Florian Lang für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit stets meine eigenen Ideen mit einzubringen, bedanken. Seine Begeisterungsfähigkeit und sein Enthusiasmus für die Wissenschaft sucht seinesgleichen.

Danken möchte ich außerdem meiner Betreuerin Prof. Dr. rer. nat. Monica Palmada, die mir auch bei Misserfolgen die nötige Motivation und den unerlässlichen Optimismus wiederbrachte. Meinem Betreuer Prof. Dr. rer. nat. Christoph Böhmer möchte ich danken, dass er mir die Elektrophysiologie so verständlich nahe brachte und mir bei technischen Problemen immer ruhig und klar bei Seite stand. Beide waren essentiell für das Gelingen dieser Arbeit.

Weiterhin sei Frau Birgitta Noll und Effi Faber gedankt, die eine große Hilfe bei molekularbiologischen Fragen waren und auch bei der Ausführung der Molekularbiologie mit Rat und Tat zur Seite standen.

Für die technische Unterstützung in beinahe allen Angelegenheiten möchte ich Herrn Uwe Schüler und im Besonderen Herrn Peter Dürr danken.

Meine Kollegen im Labor Ricco Lindner und Sankarganesh Jeyaraj möchte ich danken. Sie waren nicht nur eine große Hilfe bei molekularbiologischen und elektrophysiologischen Fragen. Ohne sie wären viele Laborstunden weniger kommunikativ und kurzweiliger verlaufen.

Einen ganz besonderen Dank richte ich an meinen sehr guten Freund Fabian Klaus, ohne den diese Arbeit nicht zu dem geworden wäre, was sie heute ist.

Zu guter letzt geht mein Dank an meine Eltern und meine drei Schwestern, die mir immer den familiären Rückhalt gaben und mir es überhaupt erst ermöglicht haben bis hierher zu kommen. Außerdem danke ich Vera, die mir auch bei

Misserfolgen stets zur Seite stand und viele ihrer Stunden mit mir im Labor verbracht hat. Auf sie alle konnte ich jederzeit zählen.

Vielen Dank!

## 7.2 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Laufer  
Vorname: Jörg Benjamin  
geboren am/in: 15. April 1984 in VS-Villingen

### Schulbildung

1990 – 1994 Grundschule VS-Weilersbach  
1994 – 2003 Gymnasium am Deutenberg VS-Schwenningen  
Abgang mit Abitur

### Zivildienst

2003 – 2004 Zivildienstleistender beim Diakonischen Werk in VS-Schwenningen in der ambulanten Alten- und Krankenpflege

### Studium

2004 – 2010 Studium der Humanmedizin an der Eberhard Karls Universität Tübingen  
19. September 2006 Ärztlichen Prüfung (1. Abschnitt)  
2006 – 2009 Doktorarbeit am Physiologischen Institut I  
März 2008 Posterpräsentation auf dem 87. deutschen Physiologenkongress in Köln  
2008 Promotionsstipendium der medizinische Fakultät Tübingen  
August 2009 – Juli 2010 Praktisches Jahr, Diakonie Klinikum Stuttgart  
17. November 2010 Ärztliche Prüfung (2. Abschnitt)

**Beruf**

Januar 2011 – heute      Assistenzarzt, Klinik für Unfallchirurgie und  
Orthopädie, Marienhospital Stuttgart