

Aus dem Institut für Physiologie der Universität Tübingen

Abteilung Physiologie I

Direktor: Professor Dr. F. Lang

**Untersuchung der Regulation der Aktivität des
Aminosäuretransportes über SN1 durch die GSK3 β
sowie die Regulation der Aktivität des Na⁺-gekoppelten
Glukosetransportes über SGLT1 und der Aktivität der
Na⁺/K⁺-ATPase durch β -Catenin.**

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

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

**vorgelegt von
Jan Martin Wilmes
aus
Dortmund**

2014

Dekan: Professor Dr. I. B. Authenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. Dr. M. Föllmer

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Ullrich

Für Anna und meine Eltern

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-abhängige Kinase
ANOVA	Varianzanalyse
ATP	Adenosintriphosphat
BaCl ₂	Bariumchlorid
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CK1	Casein Kinase 1
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIF	Direkte Immunfluoreszenz
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Fz Rezeptor	Frizzel Rezeptor
GLUT	Glukosetransporter
GSK	Glykogensynthase Kinase
Her2/Neu	Human Epidermal Growth Receptor 2
HMIT	H ⁺ /Myo-Inositol-Transporter
IIF	Indirekte Immunfluoreszenz

K ⁺	Kaliumion
KCL	Kaliumchlorid
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Na ⁺	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
oub	Ouabain
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
RNA	Ribonukleinsäure
s.	siehe
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SGK	Serum- und Glukokortikoid-induzierbare Kinase
SGLT	natriumabhängiger Glukosetransporter
SLC	Solute Carrier
SMIT	Natrium-Myo-Inositol-Cotransporter
SN1	System 1 (Glutamintransporter)
Tab.	Tabelle
TCF	T-Zell-Faktor
TEVC	Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Die Familie der Glukosetransporter.....	3
1.2 Der Natrium/Glukose-Cotransporter SGLT1.....	3
1.3 Die Na ⁺ /K ⁺ -ATPase.....	5
1.4 Der Wnt-Signalweg.....	7
1.5 β -Catenin.....	9
1.6 Die GSK3 β	11
1.7 Der Aminosäuretransporter SN1.....	11
1.8 Ziel und Aufbau der Arbeit.....	14
2. Material und Methoden.....	15
2.1 Material.....	17
2.1.1 Lösungen und Substanzen.....	17
2.1.2 Messgeräte.....	24
2.2 Methoden.....	25
2.2.1 Xenopus Laevis Oozyten als Expressionssystem für Transporter und Ionenkanäle.....	25
2.2.2 Oozytenpräparation.....	29
2.2.3 Injektion der cRNA in die Oozyten.....	30
2.2.4 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC).....	32
2.2.5 Statistische Auswertung.....	33
2.2.6 Immunzytochemie.....	34
2.2.7 Konfokale Mikroskopie.....	36
2.2.8 Chemilumineszenz.....	37
2.2.9 Ussingkammer.....	38
3. Ergebnisse.....	41
3.1 Die Abhängigkeit der Na ⁺ /K ⁺ -ATPase-Aktivität von β -Catenin.....	43
3.2 Die Stimulation der SGLT1-Aktivität durch β -Catenin.....	49
3.2.1 Untersuchungen mit der Zwei-Elektroden- Spannungsklemme.....	49

3.2.2 Immunhistochemie.....	54
3.3 Stimulation des Aminosäuretransporters SN1 durch die GSK3 β	57
3.3.1 Untersuchungen mit der Zwei-Elektroden- Spannungsklemme.....	57
3.3.2 Ussingkammerexperimente	62
4. Diskussion.....	65
4.1 Fehlerdiskussion.....	67
4.1.1 Herstellung der chemischen Lösungen.....	67
4.1.2 Geräte.....	67
4.1.2.1 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme.....	67
4.1.2.2 Ussingkammer.....	68
4.1.3 Auswertung der Messergebnisse der TEVC-Messungen....	68
4.1.4 Injektion der cRNA und Präparation der Oozyten.....	70
4.2 Ergebnisdiskussion.....	71
4.2.1 Die Regulation Na ⁺ /K ⁺ -ATPase-Aktivität durch β -Catenin...72	
4.2.2 Die Regulation der SGLT1-Aktivität durch β -Catenin.....	74
4.2.3 Die Rolle von β -Catenin für die Regulation des trans- membranösen Transports.....	76
4.2.4 Die Regulation der Aktivität von SN1 durch die GSK3 β	77
5. Zusammenfassung.....	79
6. Literaturverzeichnis.....	85
7. Publikationen.....	95
8. Erklärung.....	99

1. Einleitung



1.1 Die Familie der Glukosetransporter

Glukose ist einer der wichtigen Energielieferanten des Menschen. Sie wird hauptsächlich in Form von komplexen Kohlenhydraten mit der Nahrung aufgenommen. Im Darmtrakt wird sie durch Enzyme aufgeschlossen und im Dünndarm mit Hilfe von Glukosetransportern in die Zellen des Bürstensaumes absorbiert. Die Menge an Glukose, welche im Körper gespeichert vorliegt, beträgt zwischen 250 g und 450 g und verändert sich im Laufe des Tages. Allein das menschliche Gehirn verbraucht innerhalb von 24 Stunden ca. 125 g an Glukose (Wright EM, 2007).

Auch in den Nierentubuli werden Glukosetransporter exprimiert. Die täglich in einer Größenordnung von ca. 180 g filtrierte Glukose wird hier unter normalen Bedingungen durch Glukosetransporter komplett rückresorbiert (Wright EM, 2007).

Es existieren zwei Familien von Glukosetransportern:

- Die Familie der **SLC2** (SLC2 A1 - A13), auch genannt GLUT (GLUT 1 – 12). Sie sind verantwortlich für den passiven Glukosetransport über Zellmembranen (Uldry M, 2004).
- Die Familie der **SLC5** bestehend aus den SGLTs (SGLT 1 - 6). Sie arbeiten mit einem sekundär aktiven Na^+ -abhängigen Cotransport von Glukose (Wright EM, 2004).

1.2 Der Natrium/Glukose-Cotransporter SGLT1

Wie oben bereits erwähnt, gehört der SGLT1 zu der Familie der SLC5. Er ist der Prototyp einer Familie von Membranproteinen, welche die intrazelluläre Anreicherung von Nährstoffen mit einem elektrochemischen Potential über die

Zellmembran vereinigen (Wright EM, 1993). Bereits im Jahre 1961 wurde von Crane et al. gezeigt, dass der Glukosetransport über den Bürstensaum des Dünndarmes Na^+ -abhängig erfolgt (Crane RK, 1961). Im menschlichen Körper wird er in Zellen des Darms, der Trachea, der Nieren, des Herzes, des Gehirns, der Hoden und der Prostata exprimiert. Er nutzt den Na^+ -Gradienten über die Membran, um ein Molekül Glukose mit zwei Molekülen Na^+ in die Zelle zu transportieren. Es handelt sich bei diesem Vorgang um einen sekundär aktiven Cotransport, da der erforderliche Na^+ -Gradient durch die ATP-abhängige Na^+/K^+ -ATPase aufgebaut werden muss (**s. Abb. 1**). Das natürliche Substrat des SGLT1-Cotransporters ist neben Glukose auch Galaktose mit einer Affinität von ($K_{0,5}$) 0.5 mM. Mutationen im SGLT1-Gen mit einem Defekt des SGLT1 verursachen eine Malabsorption von Glukose und Galaktose (Wright EM 2004).

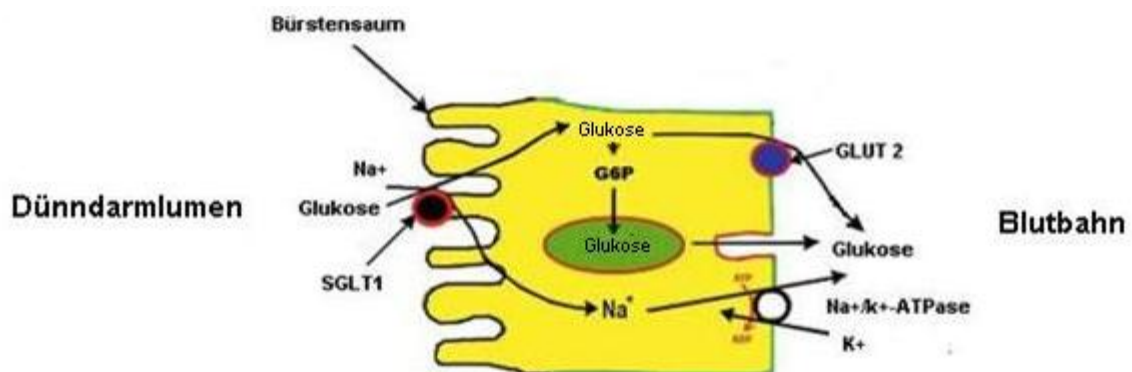


Abbildung 1: Glukoseabsorption der Dünndarmschleimhaut am Beispiel eines Enterozyten.

Schematisches Modell für die Glukoseabsorption über den Bürstensaum der Dünndarmschleimhaut am Beispiel eines Enterozyten. Glukose wird hier aus dem Dünndarmlumen durch Na^+ -Cotransport über die Zellmembran in die Zelle transportiert. Sie reichert sich in der Zelle an und diffundiert basolateral über GLUT in das Blut. Das Na^+ wird ebenfalls basolateral über die Na^+/K^+ -ATPase aus der Zelle gepumpt. Ein Teil der intrazellulären Glukose wird mit Hilfe von Endosomen über Exocytose in das Blut abgegeben (Wright EM, 2004).

1.3 Die Na⁺/K⁺-ATPase

Im menschlichen Körper unterscheidet sich der extrazelluläre Gehalt an Ionen vom intrazellulären Ionengehalt. In der Zelle befindet sich unter anderem eine deutlich geringere Konzentration an Na⁺-Ionen als außerhalb. Bei der K⁺-Konzentration verhält es sich genau umgekehrt. Hier befindet sich eine hohe Konzentration in der Zelle, während sich außerhalb der Zelle eine deutlich geringere Menge K⁺ befindet. Neben diesen beiden wichtigen Elektrolyten spielen auch Cl⁻-Ionen, Ca²⁺-Ionen und geladene Proteine eine große Rolle (Schmidt RF, 2000) (**s. Tab. 1**).

Tabelle 1: Intrazelluläre und extrazelluläre Verteilung der Ionen der menschlichen Zelle im Vergleich

	Intrazellulär (mmol/l)	Extrazellulär (mmol/l)
Na ⁺	8 - 30	145
K ⁺	ca. 155	5
Ca ²⁺	0,0001	2
Cl ⁻	4 - 30	120
HCO ³⁻	8 - 15	25
Sonstige Anionen	100 - 150	5

Um das für das Überleben und die Funktion der Zelle notwendige elektrochemische Energiepotential aufrechtzuerhalten, ist wiederum Energie zur Erzeugung eben dieses Potentials notwendig. Bereits im Jahre 1957 wurde von Skou et al. eine von Mg²⁺-, Na⁺- und K⁺-Ionen abhängige ATPase-Aktivität in

einer Membranfraktion aus Krabbenerven nachgewiesen (Skou JC, 1957). Später gelang der Nachweis, dass die Na^+/K^+ -Pumpe, deren Existenz schon früher postuliert worden war (Dean RB, 1941; Overton E, 2002), die Na^+ -, K^+ - und Cl^- -Gradienten in Muskelzellen aufrecht erhält.

Die Na^+/K^+ -ATPase gewinnt ihre Energie aus der Hydrolyse von ATP zu ADP. Mit der aus diesem Prozess gewonnenen Energie pumpt sie drei Na^+ -Ionen aus der Zelle heraus. Im Austausch dazu werden zwei K^+ -Ionen in die Zelle hineingepumpt. In der Summe entspricht dies pro einzeltem Transportschritt einer positiven Ladung aus der Zelle heraus (Glynn IM, 1984). Die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase trägt somit zum Membranpotential bei und ist elektrogen (Läuger P, 1991) (**s. Abb. 2**).

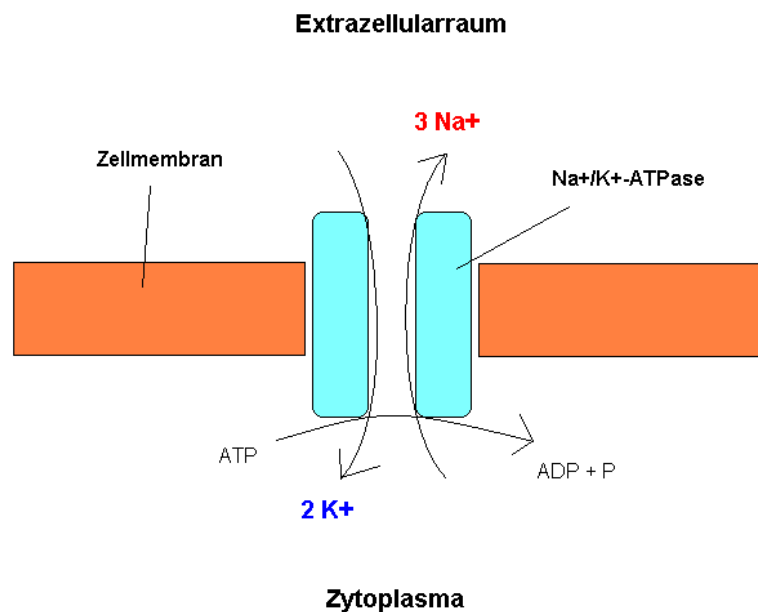


Abbildung 2: Die Na^+/K^+ -ATPase

Schematische Darstellung der Na^+/K^+ -ATPase mit Darstellung des elektrogenen Na^+/K^+ -Transportes.

Die Na⁺/K⁺-ATPase verbraucht ca. 30-70% des Gesamtenergiebedarfs einer Zelle. Pro einzelner Na⁺/K⁺-ATPase werden ca. 150 – 600 Na⁺-Ionen pro Sekunde umgesetzt (Schmidt RF, 2000).

Die Zellmembran ist nie vollständig gegenüber dem Extrazellularraum abgedichtet. Es besteht ständig ein geringer Leckstrom von Na⁺-Ionen über die Zellmembran in das Zytoplasma. Auch laufen in der Zelle ständig physiologische Prozesse ab, wie z.B. die Tätigkeit des Na⁺-abhängigen Glukosetransportes über den SGLT1, mit denen Na⁺ in die Zelle gelangt. Die Na⁺/K⁺-ATPase hält durch das Zurückpumpen des Na⁺ in den Extrazellularraum die Zellfunktionen und den elektrochemischen Konzentrationsgradienten für Na⁺ aufrecht (Clausen T, 1996; Gloor SM, 1997).

1.4 Der Wnt-Signalweg

Die Proteine GSK3 β und β -Catenin, auf die in dieser Arbeit näher eingegangen wird, sind beide integrale Proteine des Wnt-Signalweges.

Die Bezeichnung „Wnt“ setzt sich aus den Begriffen „*wingless*“ und „Int-1“ zusammen. Der Begriff „*wingless*“ entstand bei Experimenten mit der Taufliede (*Drosophila melanogaster*). Eine Mutation im Wg-Gen führte hier zum Fehlen von Flügeln bei der Fliege.

Das Int-1-Gen ist abgeleitet vom gleichnamigen Gen, dessen Aktivierung durch Integration des *mouse mammary tumor virus* (MMTV) entstehen kann. Dies wiederum ruft die Ausbildung von Brustkrebs in der Maus hervor (Nusse R, 1982). Durch den Wnt-Signalweg werden viele grundlegende zelluläre Prozesse, wie z.B. die Balance zwischen Proliferation und Differenzierung oder Überleben versus Apoptose, gesteuert (Hoppler S, 2007; Logan, 2004) (**s. Abb. 3**).

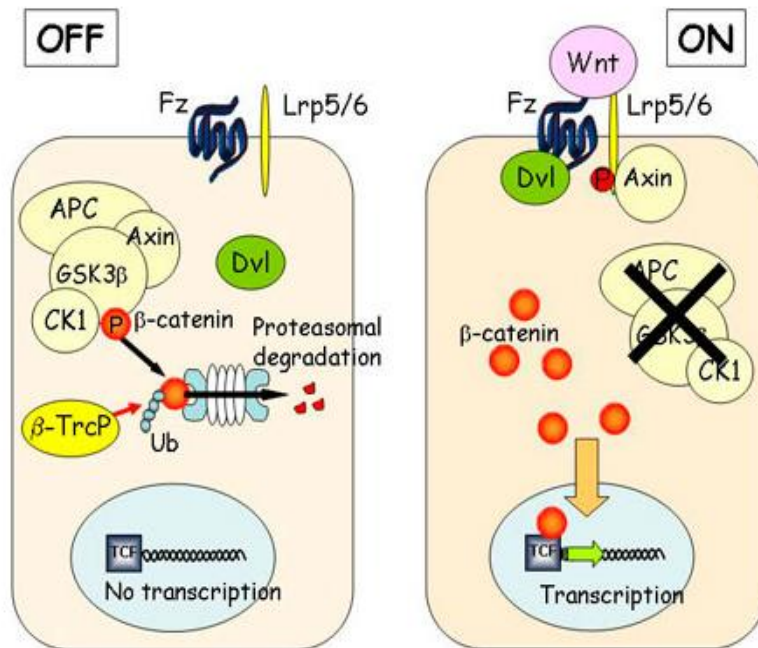


Abbildung 3: Der Wnt-Signalweg.

Im nicht aktiven Zustand ist kein Wnt-Signalprotein an den sogenannten Frizzled Rezeptor (FZ) gebunden. Das intrazelluläre Protein Dishevelled (Dvl) ist in diesem Fall deaktiviert. In diesem Zustand baut ein Komplex aus APC, Axin, der GSK3 β und der CK1 β -Catenin in der Zelle ab.

Bindet nun ein Wnt-Signalprotein an den Frizzled Rezeptor, wird das Protein Dishevelled aktiviert, welches daraufhin den β -Catenin abbauenden Komplex deaktiviert. β -Catenin reichert sich nun in der Zelle an und tritt in den Zellkern über, um spezifisch an den intranukleären T-Zellfaktor (TCF) zu binden. Dieser Proteinkomplex aktiviert nun die Transkription (Jin T, 2008).

In der Pathogenese der polyzystischen Nierenerkrankung spielt ein Defekt im Wnt-Signalweg eine Rolle (Benzing T, 2007). Die polyzystische Nierenerkrankung entsteht aufgrund gestörter Zellproliferation, epithelialer Polarität und gestörten mikrotubulären Transports (Benzing T, 2007). Die Krankheit geht einher mit einer exzessiven Anreicherung von β -Catenin in der Zelle (Harris PC, 2008; Simons M, 2006), was zu einer ungebremsten

Stimulation der Proliferation durch β -Catenin führen kann (Peruzzi B, 2006) (**s. Abb. 4**).



Abbildung 4: Die polyzystische Nierenerkrankung

Bild zweier Nieren eines Patienten mit polyzystischer Nierenerkrankung.

Quelle: www.cdc.gov

1.5 β -Catenin

Das Protein β -Catenin übernimmt in der humanen Zelle zwei unterschiedliche Aufgaben. Einerseits ist es an der Bildung von Zell-Zellkontakten wie der Zonula adherens und den Adherens Junctions beteiligt. Andererseits ist es ein Schlüsselprotein im Wnt-Signalweg, wo es zusammen mit einem Transkriptionsfaktor, dem T-Zell-Faktor (TCF), die Transkription aktiviert.

Welche Funktion β -Catenin in der Zelle übernimmt, ob innerhalb der Zell-Zellkontakte oder im Rahmen des Wnt-Signalweges, wird durch den jeweiligen Phänotyp der Zelle bestimmt (Harris TJ, 2005).

Die Zonula adherens wird durch das Transmembranprotein E-Cadherin sowie durch β -Catenin und α -Catenin gebildet. E-Cadherin bindet auf zyto-

plasmatischer Seite an β -Catenin, welches über α -Catenin an das zelluläre α -Aktinin-Zytoskelett bindet. (Brembeck FH, 2006; Conacci-Sorrell M, 2002) (s. **Abb. 5**).

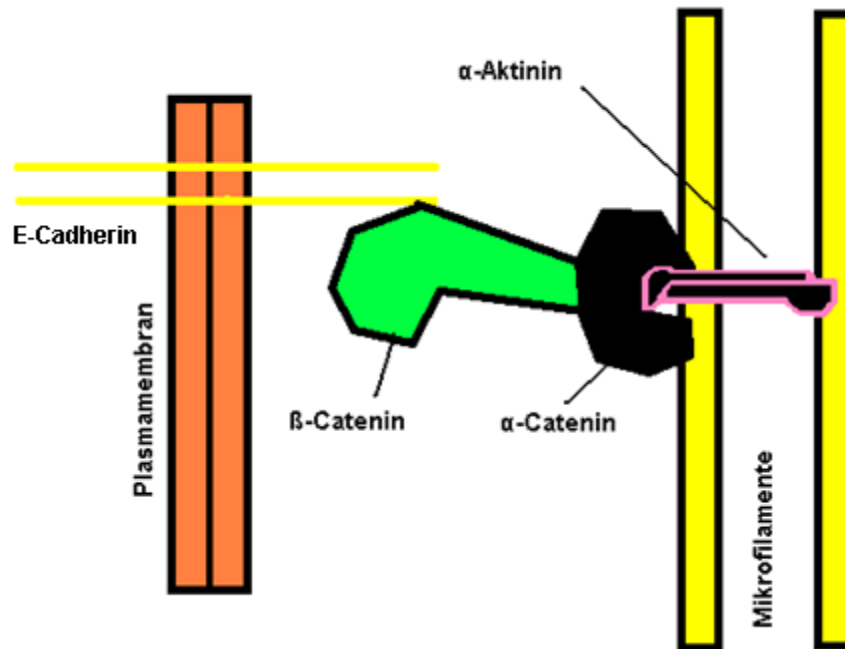


Abbildung 5: β -Catenin in einer Zonula adherens

Schematische Darstellung der Rolle von β -Catenin in der Zonula adherens einer menschlichen Zelle.

Die zweite Aufgabe von β -Catenin liegt in der Bindung des sich intranukleär befindenen TCF (Behrens J, 1996; Molenaar M, 1996). β -Catenin initiiert hier die transkriptionelle Aktivierung von Genen, welche eine Bindungskomponente für diesen entsprechenden β -Catenin / TCF-Proteinkomplex haben (Hatzis P, 2008). Eine Steuerungsfunktion dieser transkriptionellen Aktivierung ist der oben beschriebene Wnt-Signalweg (Jin T, 2008) (s. **Abb 3**).

1.6 Die GSK3 β

Die Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK3 β) ist unter anderem ein Protein des Wnt-Signalwegs. Hier baut sie in einem Komplex mit APC, Axin, und der CK1 β -Catenin in der Zelle ab.

Sie wurde erstmals als eine die Glykogensynthese hemmende Kinase entdeckt. Später stellte sich heraus, dass sie an vielen weiteren zellulären Funktionen beteiligt ist (Cohen P 2001; Cole AR, 2008).

Die GSK3 β wird durch Phosphorylierung reguliert und somit durch den Wnt-Signalweg inhibiert (Cole AR, 2008) (**s. Abb. 3**). Zusätzlich wird sie inhibiert durch die Proteinkinase B PKB/AKT (Cross HR, 1995; Mora A, 2005; Shaw M, 1997) und die Serum- und Glukokortikoid-induzierbare Kinase (SGK) (Sakoda H, 2003; Wyatt AW, 2006).

Die GSK3 β hat Auswirkungen auf die Körpertemperatur, den Blutdruck, die Flüssigkeits- und Nahrungsaufnahme, den Stuhlgang, die glomeruläre Filtrationsrate, die Urinflussrate, die Urinosmolarität, die Urinkonzentration von Na⁺, K⁺ und Harnstoff sowie auf die selektive Permeabilität des glomerulären Filters der Nieren (Boini KM, 2008; Boini KM, 2009).

1.7 Der Aminosäuretransporter SN1

Für Aminosäuretransporter wie den SN1 wurde von der Arbeitsgruppe Christensen die Bezeichnung „System“ eingeführt (Christensen HN, 1990). Dieses System wurde in Leberzellen einer Ratte erstmals 1980 beschrieben und ist selektiv für Glutamin, Asparagin und Histidin. Diese Aminosäuren enthalten in den Seitenketten Stickstoff (N). Aufgrund dessen wurde das System als System N bezeichnet (Kilberg MS, 1980).

Nach Isolierung der cDNA wurde das System N als Aminosäuretransporter SN1 bezeichnet. Die Glutaminaufnahme verschiedener Zellen läuft über den SN1 (Kilberg MS, 1980).

Der SN1 hat die Eigenschaft, Protonen sowie Na⁺-Ionen über Cotransport zu befördern. Außerdem ist er an Glutaminefflux und -aufnahme beteiligt (Boulland JL, 2002; Chaudhry FA, 1999). Beim Aminosäuretransport über SN1 handelt es sich um einen elektrogenen Transport. Es werden zwei Na⁺-Ionen in Kombination mit Glutamin gegen ein H⁺-Ion in die Zelle transportiert (Fei YJ, 2000). Der Glutaminstoffwechsel in der Leber spielt bei der Kontrolle des Ammoniakspiegels im venösen Blut eine wichtige Rolle (Newsholme P, 2003) **(s. Abb 6)**.

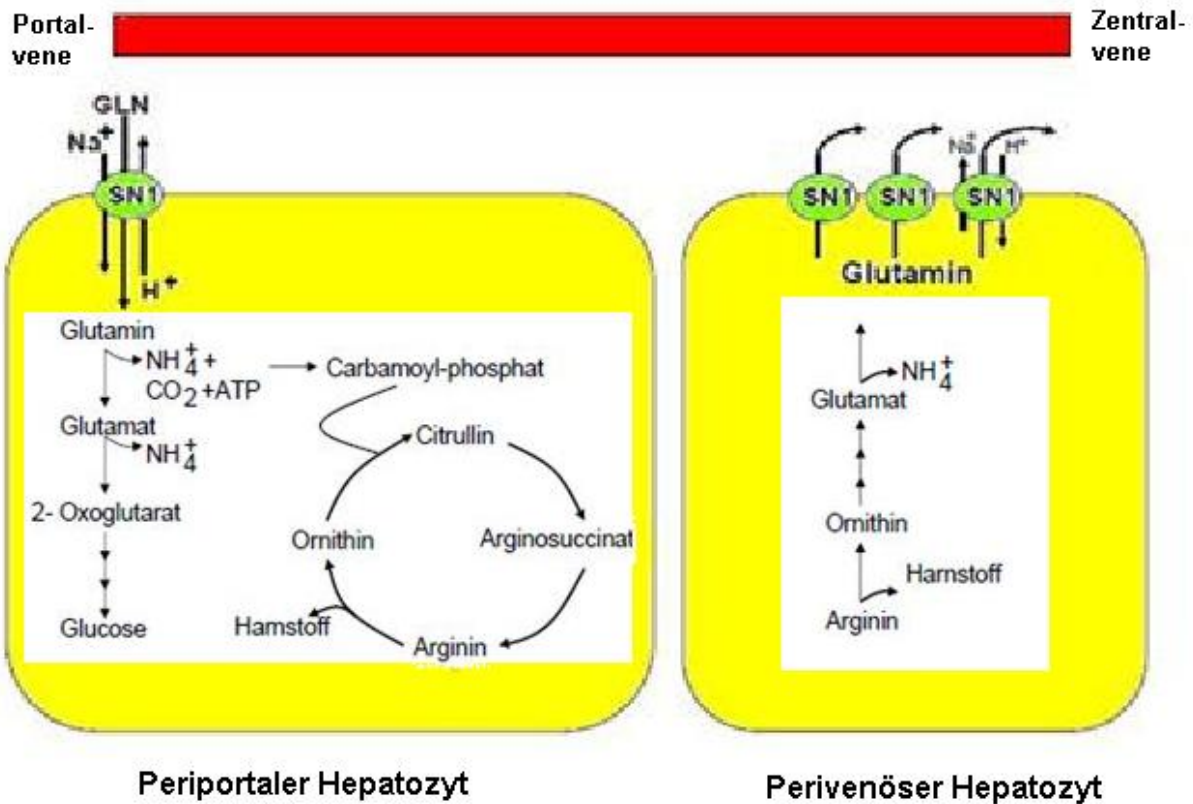


Abbildung 6: Die Funktion von SN1 am Beispiel von Hepatozyten.

Schematische Abbildung der Funktion des Aminosäuretransporters SN1 im Glutamin-Stoffwechsel der Leber. Glutamin wird von den periportalen Hepatozyten aufgenommen. Diese Hepatozyten besitzen eine Glutaminaseaktivität. Das durch diese Glutaminaseaktivität entstandene Ammoniak dient der Synthese von Carbamoyl-Phosphat (Bode BP, 2001; Newsholme P, 2003). Aufgrund des daraus resultierenden geringeren Glutamingehaltes in den Lebervenen wird Glutamin von den perivenösen Hepatozyten wieder ins Blut abgegeben. Hier liefert der Argininkatabolismus das für die Glutaminsynthese erforderliche Glutamat (D, 1998).

1.8 Ziel und Aufbau der Arbeit

Anhand der vorhergehenden Erläuterungen sollte deutlich werden, wie wichtig sowohl der Aminosäure- als auch der Glukosetransport für den Elektrolythaushalt sowie für die Funktion der menschlichen Zelle sind.

Es ergibt sich die Frage, wie und durch welche Regulatoren bzw. Initiatoren die Aktivität dieser transmembranösen Transporte jeweils neben den bereits bekannten Mechanismen reguliert wird.

Ziel der vorliegenden Arbeit sollte sein, die Regulation der Aktivität des Aminosäuretransportes über SN1, die Regulation der Aktivität der Na⁺/K⁺-ATPase und die Regulation der Aktivität des Na⁺-gekoppelten Glukosetransportes über den SGLT1 zu untersuchen.

In dieser Untersuchung war von Bedeutung, welchen Einfluss die oben bereits beschriebenen Proteine β -Catenin und die GSK3 β im Rahmen dieser Prozesse haben.

Dazu werden zunächst in Kapitel 3 die eingesetzten Mittel und Methoden dargestellt, die zur Erforschung dieses Fragekomplexes notwendig waren und zur Anwendung gelangten.

Anschließend werden dann im 4. Kapitel die Ergebnisse der Labormessungen beschrieben und interpretiert.

Im 5. Kapitel der Arbeit folgt die Fehler- sowie die Ergebnisdiskussion.

Eine zusammenfassende Bewertung stellt mit dem 6. Kapitel den Abschluss der Arbeit dar.

Das Literaturverzeichnis sowie Publikationen zum Thema und die persönliche Erklärung des Verfassers finden sich im Anhang.

2. Material und Methoden



2.1 Material

2.1.1 Lösungen und Substanzen

Die Oozyten für die Messungen mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme, die in Abschnitt 2.2.1 näher beschrieben werden, mussten nach der Präparierung in eine Standardlösung eingebracht werden. Als Standardlösung für die Arbeit mit den Oozyten wurde eine ND96-Lösung auf der Grundlage doppelt destillierten und sterilisierten Wassers verwendet (**s. Tab. 2**). Je nach Bedarf für unterschiedliche Messungen wurde die Lösung entsprechend verändert bzw. unterschiedlich angemischt. Tris-HEPES diente als Puffer. Soweit nicht weiter angegeben, wurde die ND96-Stammlösung mit 10 M-NaOH-Lösung auf einen pH-Wert von 7,4 titriert.

Tabelle 2: Zusammensetzung von ND 96-Lösung

Substanz	Konzentration
NaCl	96 mM
KCL	2 mM
CaCl ₂	1,8 mM
MgCl ₂	1 mM
Tris-HEPES	5 mM
pH (titriert mit NaOH)	7,4

Zur Untersuchung der Aktivität des Na⁺-abhängigen Glukosetransportes über den SGLT1 wurden der ND96-Lösung 10 mM Glukose beigemischt (**s. Tab. 3**).

Tabelle 3: ND96 + Glukose

ND96 +	
Substanz	Konzentration
Glukose	10 mM

Zur Messung des elektrogenen Ionentransportes der Na^+/K^+ -ATPase wurden die Oozyten für 4 Stunden in einer K^+ -freien Lösung inkubiert. Durch das Fehlen von K^+ kommt es zu einem Stillstand der Na^+/K^+ -ATPase, da das extrazelluläre Substrat fehlt. Bei längerer Inkubation in K^+ -freier Lösung steigt somit die intrazelluläre Na^+ -Konzentration an. Diese „Beladung mit Natrium“ verstärkt die messbaren Ströme der Na^+/K^+ -ATPase nach erneuter Zugabe von K^+ zur Badlösung (Horisberger JD, 1991; Crambert G, 2000). Zum Ausgleich der Osmolarität aufgrund des fehlenden K^+ wurde der ND96-Lösung die osmotisch wirksame Saccharose beigemischt (**s. Tab. 4**).

Tabelle 4: ND96 – K⁺

Sustanz	Konzentration
NaCl	96 mM
Saccharose	25 mM
CaCl ₂	1,8 mM
MgCl ₂	1 mM
Tris-HEPES	5 mM
pH (titriert mit NaOH)	7,4

Zur Untersuchung der Na⁺/K⁺-ATPase war es notwendig, die endogenen K⁺-Kanäle der Oozyten zu inhibieren. Zu dieser Inhibition wurde der ND96 – K⁺-Lösung der Kaliumkanalinhibitor BaCl₂ beigemischt. Zum Ausgleich der Osmolarität wurde weniger Saccharose beigefügt (**s. Tab. 5**).

Tabelle 5: ND 96 – K⁺ + BaCl₂

ND96 – K⁺	
Substanz	Konzentration
BaCl ₂	5 mM
Saccharose	10 mM

Um der Na⁺/K⁺-ATPase wieder K⁺ zuzuführen, wurde der ND 96 – K⁺ + BaCl₂-Lösung bei weiter vorhandenem BaCl₂ erneut K⁺ beigefügt. Saccharose zum Erhalt der Osmolarität wurde in dieser Lösung nicht mehr benötigt, da die Osmolarität durch die Zugabe von K⁺ wieder erreicht wurde (**s. Tab. 6**).

Tabelle 6: ND 96 + K⁺ 5 mM + BaCl₂

ND96 – K ⁺ 5mM	
Substanz	Konzentration
BaCl ₂	5 mM
K ⁺	5 mM

Je nach Notwendigkeit wurden folgende Chemikalien verwendet:

-Actinomycin D (10 µM)	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
-Braunol	Braun, Melsungen, Deutschland
-Brefeldin (5 µM)	Sigma, Schnelldorf, Deutschland.
-Brefeldin A	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
-Gentamycin	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
-Glutamin (5 mM)	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
-Kollagenase Typ II 1-2 mg/ml	Worthington Biochemical Corp., USA
-Leucin (5 mM)	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
-Ouabain (1 mM)	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
-Paraffin	Merck Darmstadt, Deutschland
-Paraformaldehyd	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
-PBS	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
-Phenylalanin (5 mM)	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
-SuperSignal ELISA Substrate	Pierce, Rockford, IL, USA

-Tetracain	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
-Theophillin	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
-Actinomycin D	Sigma, Schnelldorf, Deutschland

Alle weiteren in den Experimenten verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anderweitig erwähnt, von Sigma, Schnelldorf/Deutschland, bezogen.

Folgende Antikörper wurden im Rahmen der Chemilumineszenz angewendet:

- Schwein-anti-Ziegen-Antikörper FITC-markiert	Invitrogen, Carlsbad, USA
- Ziegen-anti-Ratten Antikörper	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
- Ziegen-anti-SGLT1 Antikörper	Millipore, Chemikon International, USA

Als Aufbewahrungslösung für die Oozyten zwischen bzw. vor den Messungen wurde der ND96-Stammlösung das Antibiotikum Gentamycin zugesetzt, um Infektionen der Zellen zu verhindern. Zudem wurde der Lösung das Purinalkaloid Theophillin hinzugefügt, um eine weitere Reifung der Oozyten zu unterbinden (O'Connor, 1976) (**s. Tab. 7**).

Tabelle 7: Oozyten-Aufbewahrungslösung

Substanz	Konzentration
NaCl	96 mM
KCl	2 mM
CaCl ₂	1,8 mM
MgCl ₂	1 mM
Tris-HEPES	5 mM
Natriumpyruvat	2,5 mM
Theophillin	0,5 mM
Gentamycin	50 µg/ml
pH (titriert mit NaOH)	7,4

Um die Oozyten aus den Ovarialsäckchen zu lösen, wurden sie in einer Kollagenaselösung enzymatisch defollikuliert. Hierzu wurden 1-2 mg/ml Kollagenase Typ II zu einer Ca²⁺-freien OR-2-Lösung beigemischt. Diese Lösung ist Ca²⁺-frei, da die Kollagenase unter Ca²⁺-freien Bedingungen besser ihre Wirkung entfalten kann (Masui Y, 1967) (**s. Tab. 8**).

Tabelle 8: OR-2 Lösung

Substanz	Konzentration
NaCl	82,5 mM
KCL	2 mM
MgCl ₂	1 mM
Tris-Hepes	5 mM
pH (titriert mit NaOH)	7,4

Die in den unter 2.2.9 näher erläuterten Ussingkammerexperimenten verwendete Lösung zum Befüllen der Kammern setzte sich, wie in **Tabelle 9** dargestellt, zusammen. Je nach Notwendigkeit wurde die jeweilige Aminosäure in einer Konzentration von 5 mM der luminalen Seite der Ussingkammer beigemischt. Mannitol wurde in diesem Fall in äquivalenter Menge weniger beigemischt, um die Osmolarität der Lösung konstant zu erhalten (**s. Tab. 9**).

Tabelle 9: Substanzkonzentrationen der Ussingkammer-Lösungen

Substanz	Konzentration
NaCl	115 mM
KCL	2 mM
CaCl ₂	1,25 mM
MgCl ₂	1 mM
KH ₂ PO ₄	0,4 mM
K ₂ HPO ₄	1,6 mM
Natriumpyruvat	5 mM
NaHCO ₃	25 mM
Mannitol	20 mM
pH (titriert mit NaOH)	7,4

2.1.2 Messgeräte

Für die konventionellen TEVC-Messungen wurde ein GeneClamp 500 Amplifier (Axon Instruments, USA) über einen Digidata 1300 A/D-D/A Converter mit einem handelsüblichen Windows-PC verbunden (AD Instruments, Australien). Als Messsoftware wurde ein patchClamp 9.0 Softwarepaket verwendet (Axon Instruments, USA).

Zur Injektion der RNA in die Oozyten wurde ein Nanoliter Injektor 2000 verwendet (World Precision Instruments, Deutschland).

Die verwendeten Glaskapillaren (World Precision Instruments, Deutschland) wurden mit dem DMZ Universalpuller (Zeitz Instruments, Deutschland) gezogen.

Die konfokale Mikroskopie wurde mit einem Fluoreszenz Laser Mikroskop (LSM 510 Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Deutschland) durchgeführt.

Die Chemilumineszenz der *Xenopus laevis* Oozyten wurde mit einem Luminometer (Walter Wallac Zwei-Platten-Leser, PerkinElmer, Juegesheim, Deutschland) gemessen.

2.2 Methoden

2.2.1 *Xenopus Laevis* Oozyten als Expressionssystem für Transporter und Ionenkanäle.

Die Oozyten des Afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* wurden in dieser Arbeit zur Untersuchung des Na⁺-abhängigen Glukosetransportes über SGLT1, des Aminosäuretransportes über SN1 und des Ionentransportes über die Na⁺/K⁺-ATPase verwendet. Die Oozyten verfügen über eine Reihe von Eigenschaften, die es möglich machen, von außen zugeführte cRNA auch von artfremden Spezies zu exprimieren (Gurdon JB, 1971) (**s. Abb. 7**).



Abbildung 7: Foto eines afrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*)

Quelle: www4.ncsu.edu

Der verhältnismäßig große Durchmesser der Oozyten von bis zu 1,3 mm (Dascal N, 1987) macht es möglich, die einzelnen Zellen zu separieren und mit Mikroelektroden oder Injektionspipetten unter einem Binokular zu penetrieren.

Die Zellen verfügen endogen über mindestens zwei unterschiedliche second messenger Systeme wie das IP_3 - Ca^{2+} - und das cAMP-System (Dascal N, 1987; Kusano K, 1977; Kusano K, 1982).

Die Oozyten werden in unterschiedliche Entwicklungsstadien eingeteilt. Es existieren 6 Stadien nach Dumont (Dumont JN, 1972) (**s. Abb. 8**). In elektrophysiologischen Untersuchungen sind nur Oozyten der Entwicklungsstufe V-VI zu verwenden, da diese über ausreichend endogene Proteine verfügen, um exogen zugeführte Proteine zu exprimieren. Dies wurde auch in dieser Arbeit umgesetzt.

Die Oozyten sind aus 4 unterschiedlichen Membranen aufgebaut (von außen nach innen) (Dascal N, 1987):

1. Nicht zelluläre Vitellinmembran
2. Schicht aus Follikelzellen
3. Thekazellen
4. Epithelzellschicht

Durch die weiter unten beschriebene Behandlung werden die Vitellinmembran und die Schicht aus Follikelzellen abgelöst, sodass die Oozytenmembran nur noch aus einer Theka- und Epithelzellschicht besteht.

Die *Xenopus laevis*-Oozyten besitzen eine wichtige morphologische Eigenschaft: Die Polarisierung in eine braune (animalische) und eine gelbe bis weißliche (vegetative) Hemisphäre (**s. Abb. 8**).

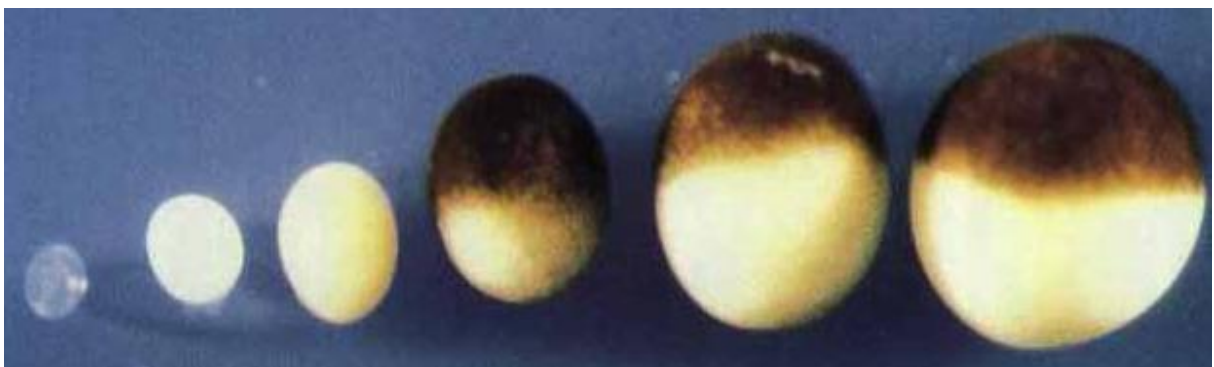


Abbildung 8: Oozyten des *Xenopus Laevis*.

Oozyten des Afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* in ihren 6 unterschiedlichen Entwicklungs-stadien nach Dumont (von links nach rechts) (Dumont, 1972). Auch gut sichtbar sind die zwei unterschiedlich gefärbten Hemisphären.

Quelle: *nd.edu*

Die animalische Hemisphäre der Oozyten beinhaltet den Zellkern. Dies ist wiederum wichtig für das Einstechen der Glaskapillaren zum Injizieren von cRNA oder zum Messen des transmembranösen Stromes. Diese Glaskapillaren dürfen den Zellkern nicht penetrieren, weil dieser dadurch zerstört und die Zelle untergehen würde.

Xenopus laevis-Oozyten haben im Stadium V – VI im defollikulierten Zustand einen Widerstand von 1-3 M Ω und eine spezifische Kapazität von 4-6 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ (Dascal N, 1987).

Von besonderer Wichtigkeit, auch für diese Arbeit, sind die intrazellulären Ionenkonzentrationen der Oozyten, da diese Einfluss auf den transmembranösen Ionentransport haben (**s. Tab. 10**).

Tabelle 10: Intrazelluläre Ionenkonzentration in Xenopus laevis Oozyten (Dascal N, 1987).

Ion	Konzentration (mM)
Na ⁺	~ 2 - 20
K ⁺	~ 100 - 120
Cl ⁻	~ 50
Ca ²⁺	~ 0,0001- 0,0004

Wichtig zu wissen ist, dass nicht zwangsläufig alle Proteine in den Oozyten exprimiert werden können. Es ist möglich, dass das Prozessieren der Proteine andersartig abläuft als im Ursprungsgewebe. Es konnte jedoch in vielen Fällen eine Übereinstimmung des Prozessierens von Proteinen im Nativgewebe und dem Prozessieren von Proteinen in der Oozytenmembran gefunden werden (Dascal N, 1987).

Um einen Strom über die Oozytenmembran messen zu können, ist es zudem wichtig, dass der zu untersuchende Transporter einen Ionengradienten erzeugt.

2.2.2 Oozytenpräparation

Die erforderlichen Oozyten wurden weiblichen *Xenopus laevis*-Fröschen entnommen. Die Entnahme wurde nach der bereits von Boehmer et al. und Strutz-Seebohm et al. beschriebenen Methode vorgenommen (Boehmer C, 2008; Strutz-Seebohm N (1), 2007).

Der Frosch wurde dazu für ca. 20 min in eine 0,1%ige Tetracain-Lösung gelegt. Wenn das Tier keine Reaktion mehr zeigte, wurde es auf ein Eisbett platziert, um eventuell auftretende Blutungen zu verlangsamen oder ganz zu verhindern. Nach großflächiger Reinigung und Desinfektion des Froschunterbauches mit Braunol wurde unter semisterilen Bedingungen ein ca. 0,5 cm großer Schnitt seitlich am Bauch gesetzt. Durch die entstandene Öffnung wurden nun die Ovarialsäckchen mit den enthaltenen Oozyten entnommen und unverzüglich in die ND96-Aufbewahrungslösung eingelegt (**s. Abb 9**). Die Wunde wurde anschließend mit resorbierbarem Nahtmaterial verschlossen.

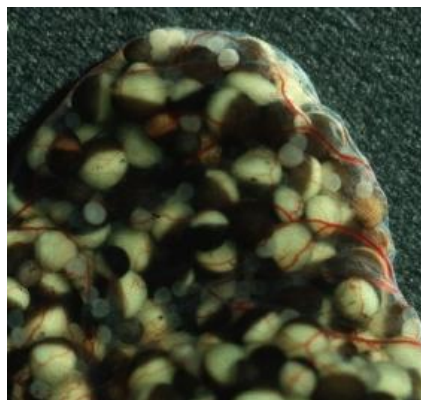


Abbildung 9: Ovarialsäckchen des Afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* im Monokular.

Quelle: ibmmsrvlakitu.unibe.ch

Die ca. 2 cm mal 2 cm großen Ovarialsäckchen wurden daraufhin mit einem Skalpell in kleinere Einheiten zerlegt, um eine bessere Angriffsmöglichkeit der Kollagenase zu gewährleisten. Daraufhin wurden die Oozyten in OR-2 Lösung gewaschen und in die Kollagenaselösung (1-2 mg/ml OR-2) eingelegt. Auf einem elektrischen Schwenkteller wurden sie anschließend bei Raumtemperatur für ca. 2-3 Stunden gelagert. Im Laufe der Kollagenasebehandlung wurde der Fortschritt des Verdaus der nicht-zellulären Vitellinmembran und der Schicht aus Follikelzellen unter dem Binokular überwacht und so der optimale Zeitpunkt zur Beendigung der Behandlung gefunden. Unmittelbar nachdem die nicht-zelluläre Vitellinmembran und die Schicht aus Follikelzellen abgelöst waren sowie die darunterliegende Schicht aus Thekazellen noch nicht angedaut war, musste die Kollagenasebehandlung gestoppt werden.

Zur Beendigung der Kollagenasebehandlung wurden die Oozyten mehrfach mit OR-2-Lösung gewaschen und die Kollagenase dadurch sorgfältig entfernt. Damit war der Proteaseprozess abgeschlossen.

Im Anschluss wurden unter dem Binokular die ausreichend reifen, unfollikulierten und intakt gebliebenen Oozyten herausselektiert (Stadium V und VI nach Dumont (Dumont JN, 1972)). Die sortierten Oozyten wurden in kleinere Gruppen bestehend aus 15-30 Oozyten in Petrischalen, die mit ND96 + Antibiotikum gefüllt waren, im Kühlschrank bei einer Temperatur von 15°C aufbewahrt. Während des Lagerns der Oozyten, die die injizierte cRNA exprimieren sollten, wurde die ND96 + Antibiotika-Lösung im Abstand von rund 24 Stunden ausgetauscht. Im gleichen Arbeitsschritt wurden untergegangene Zellen aus den Schalen entfernt.

2.2.3 Injektion der cRNA in die Oozyten

Die Injektion der cRNA in die Oozyten wurde mit Hilfe des Nanoliterinjektor 2000, bestückt mit passenden Glaskapillaren, vorgenommen. Die Glaskapillaren wurden manuell unter dem Binokular mit dem Ziel gebrochen,

einen Öffnungsdurchmesser von 10-20 μm zu erreichen. Zum Ausschluss von Luft aus den Glaskapillaren wurde in diese retrograd Paraffinöl aufgezogen. Im nächsten Schritt wurde die cRNA in die Kapillaren aufgezogen (ca. 1-2 μl). Daraufhin wurden die zu injizierenden Oozyten auf den Deckel einer Petrischale gelegt, welcher mit einem Polypropylnetz belegt war, um ein Verrutschen der Oozyten zu verhindern. Danach konnte die jeweils entsprechende Menge an cRNA in die Oozyten injiziert werden (**s. Tab 11**).

Tabelle 11: Injektionsmengen und Expressionszeit der jeweilig injizierten cRNA

	Injektionsmenge	Expressionszeit
SGLT 1	5 ng	3 Tage
β -catenin	7,5 ng	3 Tage
SN1	25ng	4 Tage
GSK3 β	5ng	3-4 Tage

Nach Injektion der cRNA wurden die Oozyten weiterhin bei 15°C zum Exprimieren der injizierten cRNA gelagert. Die Dauer der Reifungszeit war abhängig von der Expressionszeit der jeweiligen cRNA (**s. Tab. 11**).

2.2.4 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC)

Die TEVC ist eine weit verbreitete Technik, um die Gesamtsumme von elektrischen Strömen über eine Zellmembran zu messen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zur Messung der transmembranösen Ströme die Zellmembran von *Xenopus laevis*-Oozyten verwendet. Durch zwei Mikro-Glaselektroden, die in die Oozyte eingestochen wurden, wurde eine vorgegebene Potentialdifferenz E' in der Zelle im Verhältnis zum Zellbad aufrechterhalten (s. **Abb. 10**).

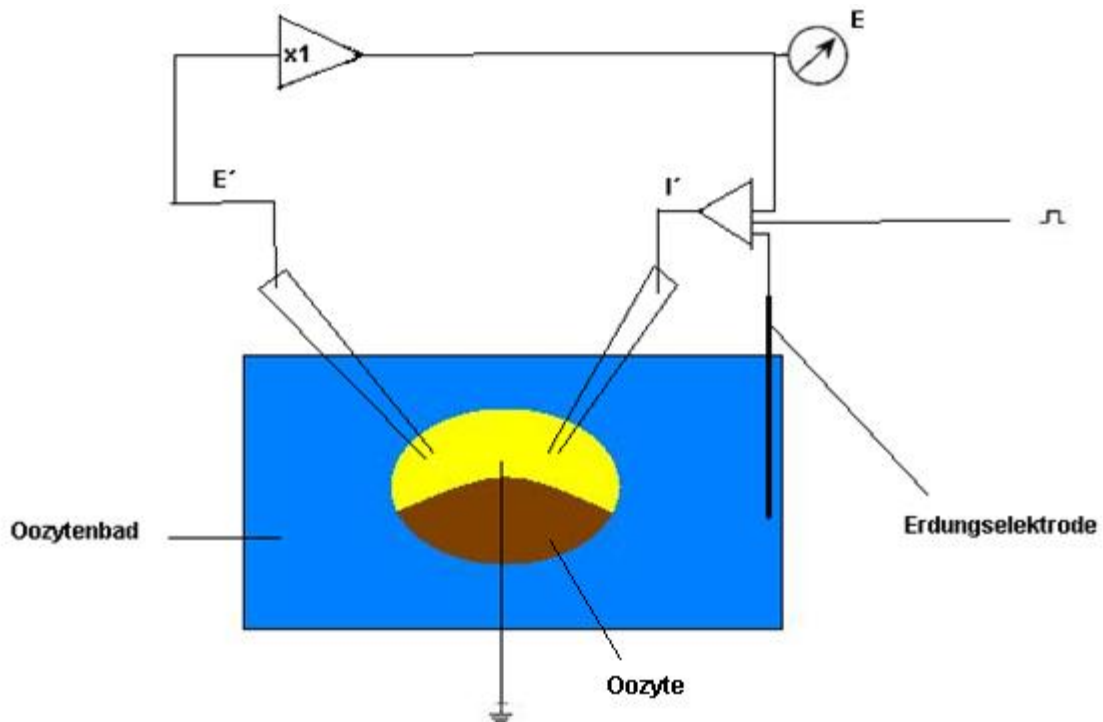


Abbildung 10: Schematischer Aufbau der TEVC-Technik

Der erforderliche Strom I' , der benötigt wird, um die vorgegebene Spannung über die Zellmembran aufrecht zu erhalten, konnte erfasst und aufgezeichnet werden (Bezanilla F, 1982; Finkel AS, 1985; Halliwell JV, 1987).

Die intrazellulären Mikroelektroden wurden mit Hilfe eines DMZ Universalpullers aus Brosilikatkapillaren (GC 150TF-15, 1.17 mm Innendurchmesser, 1.5 mm Außendurchmesser, Fa. Clark Elektromedical Instruments, GB) gezogen und mit 3 M KCl befüllt. In diese Kapillaren wurde ein mit Silberchlorid beschichteter Metalldraht eingeführt. Dieser Draht wurde mit dem GeneClamp 500 Amplifier verbunden. Nachdem beide Mikroelektroden in den Oozyten möglichst weit oberflächlich nahe der Zellmembran eingestochen wurden, erfolgten ein Nullabgleich zur Badelektrode und eine Widerstandsmessung des kompletten Messstromkreislaufes. Es wurde darauf geachtet, dass der Ohm'sche Widerstand stets zwischen 0,3 - 1,2 M Ω lag. Daraufhin konnten im Stromklemmen-Modus die gegenüber der Badelektrode anliegende Spannung E' sowie im Spannungsklemmen-Modus die Stromapplikation bei vorgeschriebenem Potential abgelesen werden.

Sämtliche Messungen wurden bei Raumtemperatur innerhalb eines Faraday'schen Käfigs durchgeführt, um den Messvorgang vor externen elektrischen Beeinflussungen abzuschirmen. Die Fließgeschwindigkeit der zugegebenen Lösungen im Oozytenbad konnte variiert werden und lag bei 20 ml/min. Der Inhalt des Bades wurde somit alle 10 s ausgetauscht.

2.2.5 Statistische Auswertung

Die Experimente wurden jeweils an unterschiedlichen Oozytenchargen mindestens dreimal wiederholt. Sofern nicht gesondert erwähnt, ergaben die einzelnen Messungen qualitativ gleichwertige Daten. Diese Daten variierten oft in der Höhe der entsprechenden Messwerte, was durch die unterschiedliche Zeitdauer der Expression und die Eigenschaften der Proteinsynthese der unterschiedlichen Oozytenchargen zu erklären war.

Die Versuchsergebnisse wurden, soweit nicht anders beschrieben, als die Mittelwerte mit dem Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Die Anzahl der Experimente wurde mit „n“ angegeben. Die Werte wurden durch ANOVA oder dem gepaarten Student- t-Test auf Signifikanz überprüft. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet.

2.2.6 Immunzytochemie

In der Immunzytochemie werden spezifische Antikörper verwendet, um die Verteilung von entsprechenden Antigenen auf Zellen sichtbar zu machen.

Wird eine zu untersuchende Zelle mit entsprechenden Antikörpern inkubiert, werden diese an ein passendes Antigen auf der Zelle binden. Um diese gebundenen Antikörper sichtbar zu machen, wird ein fluoreszierender Farbstoff oder ein Enzym an die Antikörper gekoppelt. Dieser Antikörper/Farbstoff- oder Antikörper/Enzym-Komplex kann dann zytochemisch nachgewiesen werden. Dieses Verfahren wird direkte Immunfluoreszenz (DIF) genannt (Hofbauer A, 2013) (s. Abb. 11).

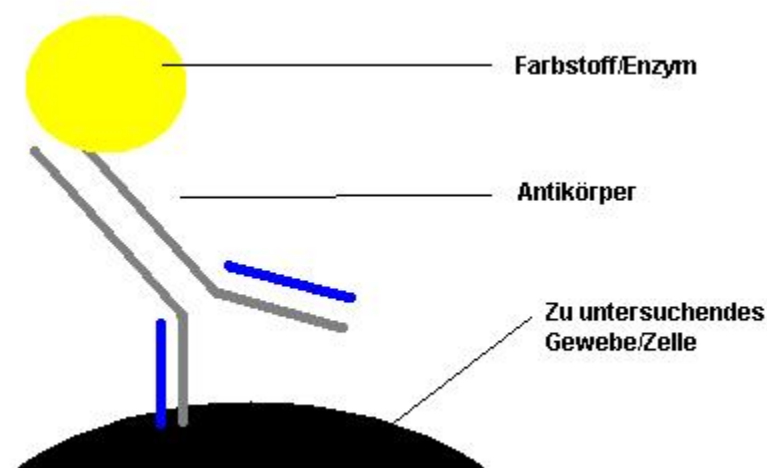


Abbildung 11: Schematische Darstellung der direkten Immunfluoreszenz (DIF).

Da die DIF sehr aufwendig ist, kann der „primäre“ Antikörper - der Antikörper, der an das Antigen der Zelle gebunden ist - mit einem zweiten „sekundären“ Antikörper markiert werden. Dieser sekundäre Antikörper ist bereits markiert und bindet spezifisch an den primären Antikörper. Der primäre Antikörper entstammt Immunglobulinen unterschiedlicher Tierspezies.

Werden das zu untersuchende Gewebe oder die zu untersuchende Zelle mit einem primären Antikörper, z.B. einer Maus, inkubiert, kann ein markierter, allgemeiner sekundärer Antikörper gegen Mausantigene zum Sichtbarmachen des primären Antikörpers verwendet werden. Diese sekundären Antikörper können kommerziell erworben werden. Dieses Verfahren wird als indirekte Immunfluoreszenz (IIF) bezeichnet (Hofbauer A, 2013) (**s. Abb. 12**).

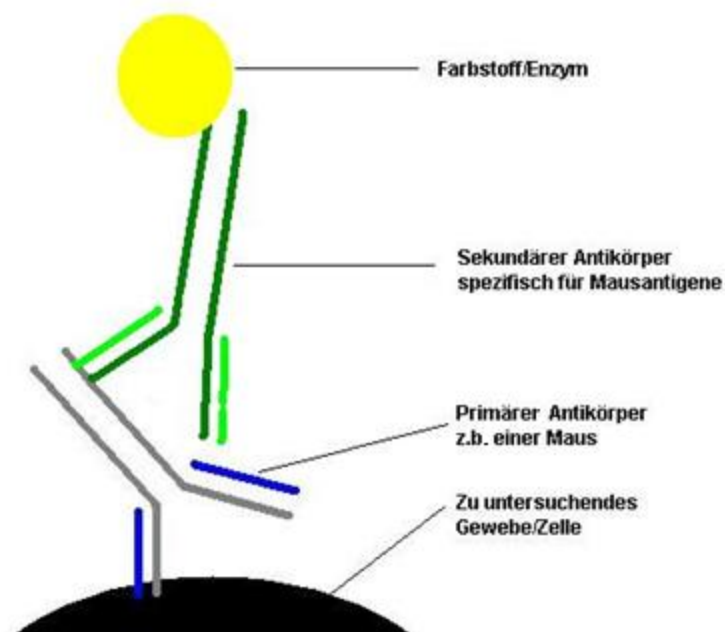


Abbildung 12: Schematische Darstellung der indirekten Immunfluoreszenz (IIF).

In dieser Arbeit wurde der Na⁺-abhängige Glukosetransporter SGLT1 durch indirekte Immunfluoreszenz (IIF) in der Zellmembran von *Xenopus laevis* Oozyten mit Hilfe von Ziegen-Antikörpern nachgewiesen.

Die Menge an gebundenen Antikörpern konnte durch die IIF quantifiziert werden, um auf die Menge an SGLT1 in der Zellmembran zu schließen. Hierzu wurden die Oozyten des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* über 12 Stunden in 4%-igem Paraformaldehyd fixiert. Im Anschluss wurden die Oozyten in 30%-iger Saccharoselösung inkubiert, um sie für das nachfolgende Einfrieren vor Zerstörung zu schützen. Nachdem die Oozyten in einer Trägerlösung eingefroren wurden, wurden sie auf einem Kryostat platziert (Gehring EM, 2009). Hier wurden die Oozyten in Scheiben von 8 µm Dicke geschnitten und bei -20°C in der Gefriertruhe aufbewahrt.

Zur weiteren Verwendung wurden die Schnitte bei Raumtemperatur entwässert und in einer Aceton/Methanol-Mischung (1:1) 15 min lang bei Raumtemperatur aufbewahrt. Anschließend wurden die geschnittenen Oozytenscheiben in PBS gewaschen und eine Stunde lang in 5%-iger Rinder-Serum-Albumin-PBS-Lösung präinkubiert.

Danach wurden die Schnitte mit einem primären Antikörper (Ziegen-anti-SGLT1 Antikörper, 1:2500 Verdünnung) über Nacht in feuchtem Milieu bei 4°C inkubiert. Der primäre Antikörper wurde im nächsten Schritt mit einem vom Schwein stammenden anti-Ziege-konjugiertem FITC-Antikörper (Verdünnung 1:1000) markiert. Die Oozyten wurden daraufhin in einem Fluoreszenz-Laser-Mikroskop mit einem A-Plan 20x/0.48 PH2-Objektiv analysiert. Helligkeit und Kontrast wurden bei jeder Untersuchung konstant gehalten.

2.2.7 Konfokale Mikroskopie

Das Konfokalmikroskop ist ein Mikroskop, das das zu untersuchende Präparat nicht wie bei einem gewöhnlichen Mikroskop komplett beleuchtet, sondern nur einen kleinen Teil des Präparates in Abhängigkeit von der Zeit. Das daraus entstehende Bild ist also eine Rekonstruktion der einzelnen

Beleuchtungsschritte. In dieser Arbeit wurde ein sogenanntes Laserrastermikroskop verwendet. Hier tastet ein Laserstrahl das zu untersuchende Präparat ab. Dieser Laserstrahl regt die Antikörper, die im Präparat an ihre entsprechenden Antigene gebunden sind, zur Fluoreszenz an. Diese erzeugte Fluoreszenz wird zur Erzeugung eines Bildes verwendet (**s. Abb 13**).

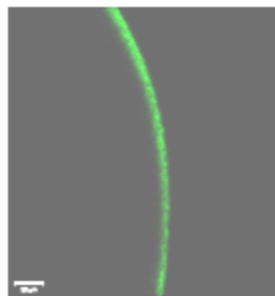


Abbildung 13: Erzeugtes Bild einer Oozytenmembran des *Xenopus laevis* im Laserrastermikroskop.

Die Oozyte wurde mit einem SGLT1-Antikörper der Ziege nach der IIP markiert.

2.2.8 Chemilumineszenz

Für die Chemilumineszenz wurden die Oozyten mit 1 µg/ml primären Antikörpern (Ziegen-anti-SGLT1-Antikörper, Verdünnung 1:2500) und 2 µg/ml sekundären, peroxidase-konjugierten, affinitätsselektierten Ziegen-anti-Ratten IgG-Antikörpern inkubiert. Die einzelnen Oozyten wurden daraufhin in 96-er Lochplatten gelegt, die mit 20 µl SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity-Substrat gefüllt waren. Die Chemilumineszenz der einzelnen Oozyten wurde daraufhin mit einem Luminometer (Walter Wallac Zwei-Platten-

Leser, PerkinElmer, Juegesheim, Deutschland) bestimmt. Das Signal wurde jeweils über eine Sekunde aufgenommen.

2.2.9 Ussingkammer

Die Ussingkammer wurde 1940 von dem dänischen Physiologen Hans Ussing erfunden (Ussing H, 1950). Mit dieser Kammer ist es möglich, den elektrischen Strom und die Potentialdifferenz über ein Epithel zu messen.

Die Ussingkammer besteht aus zwei Teilkammern, die miteinander verbunden sind. In die Verbindung wird ein Epithel eingespannt. Dadurch werden die beiden Teilkammern voneinander getrennt. Beide Teilkammern werden daraufhin mit einer physiologischen Lösung (**s. Tab. 9**) gefüllt. Durch diverse Zuleitungen ist es möglich, die Ionenkonzentration einer Teilkammer zu verändern.

In der Nähe des Epithels sind auf jeder Seite der Kammer zwei Messelektroden angebracht, über die eine Potentialdifferenz gemessen werden kann. Zwei weitere Elektroden befinden sich entfernt vom Epithel. Diese dienen als Gleichstromquelle. Hier wird der Strom in Reihe gemessen.

Findet ein Transport von Ionen über das eingespannte Gewebe statt, muss, um die vorgegebene Spannung aufrecht zu erhalten, Strom in das Wasser abgegeben werden. Dieser Strom kann über ein in Reihe angeschlossenes Amperemeter abgelesen werden und ist dann ein Maß für die Transportfähigkeit des Epithels für Ionen (Ussing H, 1950) (**s. Abb. 14**).

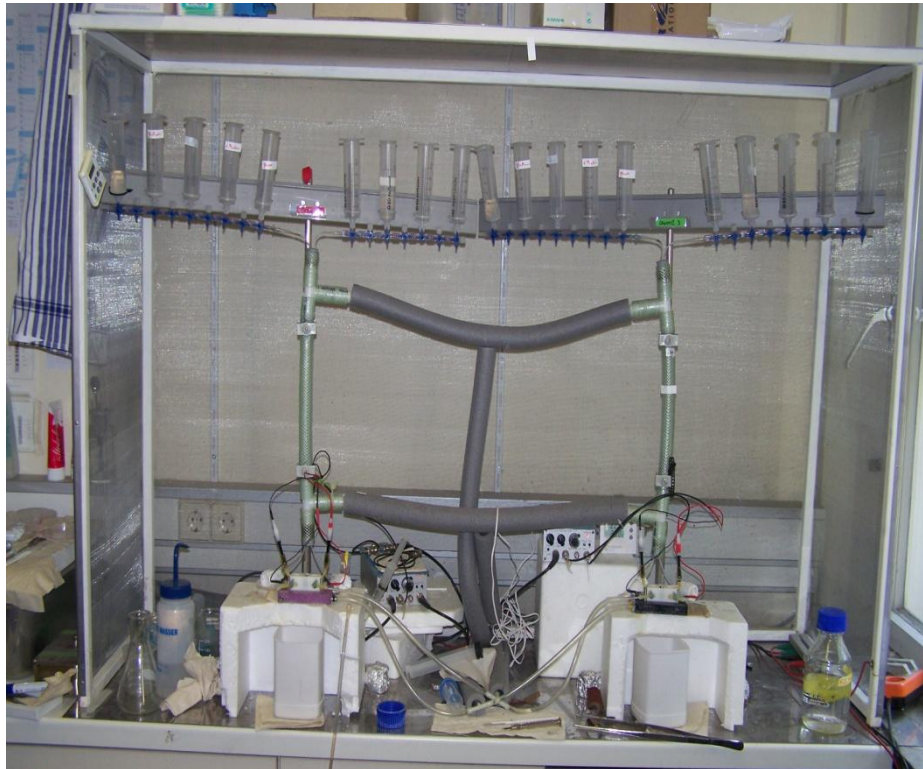


Abbildung 14: Foto der Ussingkammer der Physiologie Tübingen.

In dieser Arbeit wurde die Ussingkammer zur Analyse des elektrogenen Aminosäuretransportes von Zellmembranen des Jejunums von Mäusen verwendet. Die Verbindung beider Kammern hat eine Öffnung von 0.00769 cm^2 . Unter Kontrollbedingungen hatte die eingefüllte Lösung die in **Tabelle 9 (S. 24)** aufgezeigte Konzentration.

Bei allen Experimenten mit der Ussingkammer wurde die Potentialdifferenz der beiden Kammern kontinuierlich gemessen. Der Widerstand des Gewebes wurde anhand der anliegenden Spannung und des transepithelialen Stromes nach dem Ohm'schen Gesetz errechnet.

Die jejunalen Teilstücke des Darmes wurden für die Untersuchung genveränderter Mäusen entnommen. Die Mäuse wiesen eine Mutation des GSK3-Genes auf, so dass Ser9 von GSK3 β durch ein nicht-phosphorylierbares

Alanin (GSK3 β ^{9A/9A}) ausgetauscht ist. Zusätzlich wurde Ser21 von GSK3 α durch ein nicht-phosphorylierbares Alanin (GSK3 α ^{21A/21A}) substituiert. Diese Veränderungen führten zu der GSK3 α/β ^{21A/21A/9A/9A} Doppel-Knockin-Maus (GSK3^{KI}), die bereits durch McManus et al. beschrieben wurde (McManus EJ, 2005). Die neu entstandene GSK3^{KI} war nun nicht mehr durch die PKB/AKT hemmbar und somit aktiver als die GSK3^{WT}. Die genveränderten GSK3^{KI} Mäuse wurden in den Ussingkammerexperimenten mit ihren Wildtyp-Geschwistern (GSK3^{WT}) verglichen.

3. Ergebnisse



3.1. Die Abhängigkeit der Na⁺/K⁺-ATPase-Aktivität von β-Catenin

Zur Abschätzung der Na⁺/K⁺-ATPase-Aktivität wurden *Xenopus laevis*-Oozyten zunächst 4 Stunden lang in K⁺-freier Lösung (ND96 – K⁺) präinkubiert, um jegliche Na⁺/K⁺-ATPase-Aktivität zu unterbinden. Danach wurden die Oozyten in die Messapparatur verbracht und weiterhin mit K⁺-freier Lösung umspült. Um zusätzlich K⁺-Ströme über endogene K⁺-Kanäle der Oozyten zu verhindern, wurden diese jetzt mit dem K⁺-Kanalblocker BaCl₂ (5 mM) inkubiert.

Nachdem dem Oozytenbad wieder K⁺-haltige ND96-Lösung zugeführt worden war, konnte ein auswärtsgerichteter Na⁺/K⁺-ATPase-Pumpenstrom aufgrund des elektrogenen Transports von 3 Na⁺ auswärts und 2 K⁺ einwärts gemessen werden (s. Abb. 15).

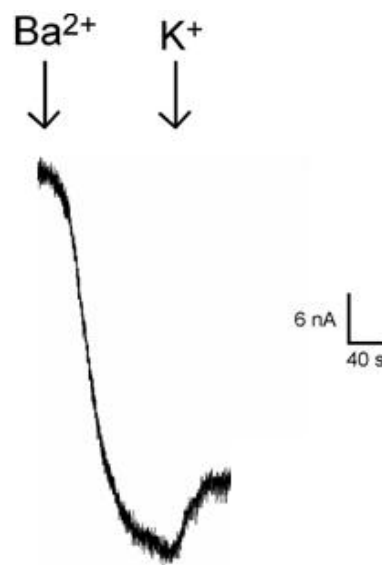


Abbildung 15: Originalspuren des Stromverlaufes über die Oozytenmembran.

Die Pfeile deuten auf den Zeitpunkt der Zugabe der jeweiligen Lösung hin.

In Anwesenheit des Na^+/K^+ -ATPase-Hemmers Ouabain (1 mM) konnte der Pumpenstrom inhibiert werden. Durch Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase wurde kein Na^+ aus der Zelle und kein K^+ in die Zelle gepumpt. Nach Wegfall dieses elektrogenen Pumpenstromes konnte durch Ouabainzugabe ein Einwärtsstrom gemessen werden, wie in **Abbildung 16** dargestellt.

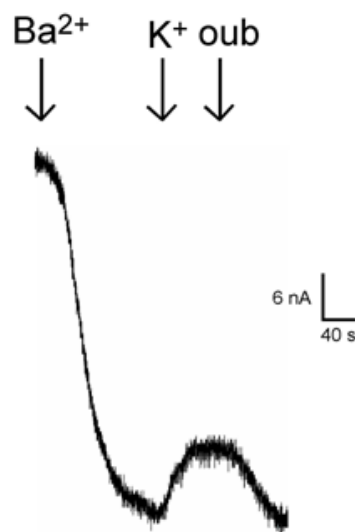


Abbildung 16: Originalspuren des Stromverlaufes über die Oozytenmembran.

Die Pfeile deuten auf den Zeitpunkt der Zugabe der jeweiligen Lösung hin. Sichtbar ist hier auch der Einwärtsstrom nach Ouabainzugabe.

Die Differenz der Höhe des Stromes ohne Ouabainzugabe und nach Ouabainzugabe ist als Maß für den Na^+/K^+ -ATPase-Pumpenstrom anzusehen. Diese Differenz sollte ungefähr der Differenz zwischen dem gemessenen Strom in kaliumfreier- und kaliumhaltiger ND96-Lösung entsprechen. War dies nicht der Fall, konnte von Leckströmen oder einer nicht ausreichenden Hemmung endogener K^+ -Kanäle der Oozyten durch BaCl_2 ausgegangen werden. Es konnte festgestellt werden, dass der Na^+/K^+ -ATPase-Pumpenstrom und der Ouabain-hemmbarer Strom in Oozyten, die mit cRNA- codierend für β -Catenin injiziert waren, signifikant höher war als in nicht mit cRNA- codierend für β -Catenin injizierten Oozyten. Zum Volumenausgleich wurde eine äquivalente Menge an

DEPC-Wasser in die Oozyten ohne cRNA-codierend für β -Catenin injiziert. An den Originalspuren der TEVC ist ein Unterschied der Stromstärke an der Ouabainkurve deutlich zu erkennen (**s. Abb 17**). Die Differenz der Höhe des Stromes ohne Ouabain und nach Ouabainzugabe ist in **Abbildung 18** dargestellt.

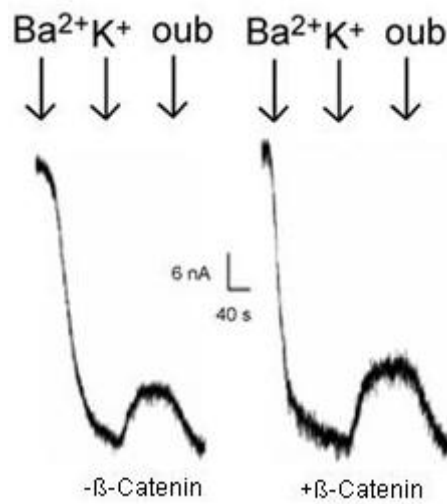


Abbildung 17: Originalspuren des Stromverlaufes über die Oozytenmembran.

Die Pfeile deuten auf den Zeitpunkt der Zugabe der jeweiligen Lösung hin. Ersichtlich ist der Unterschied der Stromstärke bei Oozyten, die mit cRNA codierend für β -Catenin (+ β -Catenin) injiziert waren, zu Oozyten, die nicht mit cRNA codierend für β -Catenin (- β -Catenin) injiziert waren.

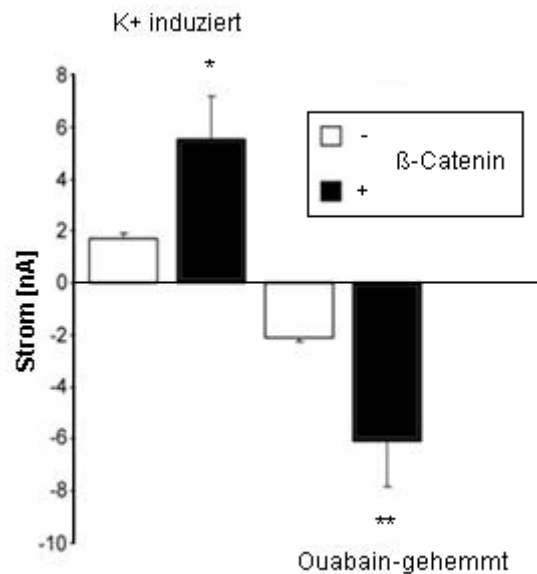


Abbildung 18: Die Regulation der Na⁺/K⁺-ATPase-Aktivität durch β-Catenin.

Arithmetische Mittelwerte + SEM (n = 13-20), des K⁺-induzierten Stromes (linke zwei Balken) und des durch Ouabain-gehemmten Stromes (rechte zwei Balken). Die weißen Balken stellen die Gruppen von Oozyten dar, welche mit DEPC-Wasser injiziert wurden. Die schwarzen Balken repräsentieren die Oozyten, welche mit cRNA-codierend für β-Catenin injiziert wurden.

*,** bedeutet signifikanter Unterschied von Oozyten, welche β-Catenin exprimierten, zu mit DEPC-Wasser injizierten Oozyten (p<0.05, p<0.01).

Die bisherigen Messungen zeigen, dass β-Catenin die endogene Na⁺/K⁺-ATPase der Oozyten stimuliert. Um zu unterscheiden, ob die Stimulation durch β-Catenin als Transkriptionsfaktor im Rahmen des β-Catenin/TCF-Proteinkomplexes des Wnt-Signalweges oder eher durch einen direkten Effekt von β-Catenin auf die Na⁺/K⁺-ATPase entsteht, wurden die Oozyten des *Xenopus laevis* nach Injektion der cRNA mit und ohne Zugabe des Transkriptioninhibitors Actinomycin D (10 μM) in der Aufbewahrungslösung über drei Tage inkubiert.

Auch unter Hemmung der Transkription, wie in **Abbildung 19** ersichtlich, stimulierte β-Catenin die Aktivität der Na⁺/K⁺-ATPase. Die Wirkung von β-Catenin erfolgte also unabhängig von der Transkription.

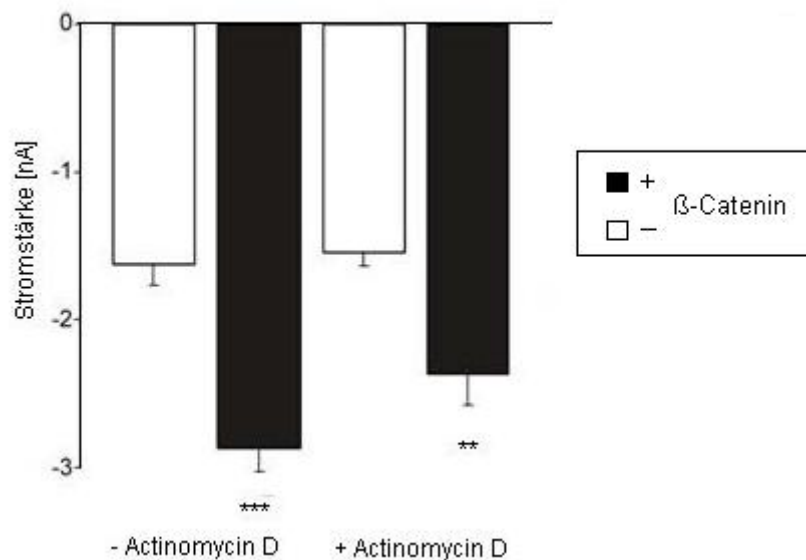


Abbildung 19: Auswirkungen von Actinomycin D auf die Regulation der Na⁺/K⁺-ATPase-Aktivität durch β-Catenin.

Arithmetische Mittelwerte + SEM (n = 9-10) des Ouabain-gehemmten Stromes über die Oozytenmembran. Die weißen Balken zeigen die Ströme der mit DEPC-Wasser injizierten Oozyten. Die schwarzen Balken zeigen die Ströme über die Zellmembran von Oozyten, die mit cRNA-codierend für β-Catenin injiziert wurden.

Die linken zwei Balken zeigen die Ströme in Abwesenheit von Actinomycin D (- Actinomycin D).

Bei den rechten zwei Balken wurden Ströme in Anwesenheit von Actinomycin D über 3 Tage (+ Actinomycin D) gemessen.

** , *** bedeutet signifikanter Unterschied von Oozyten, welche β-Catenin exprimierten, zu Oozyten, welche nicht β-Catenin exprimierten (p<0,01, p<0,001).

Theoretisch kann β-Catenin die von der Na⁺/K⁺-ATPase induzierten Ströme durch Hemmung der Rückaufnahme der Na⁺/K⁺-ATPase aus der Zellmembran erhöhen. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde der Ouabain-abhängige Strom unter Zugabe von Brefeldin A gemessen. Die Oozyten wurden hierzu 24 Stunden lang in der Aufbewahrungslösung mit Brefeldin A (5 μM) inkubiert.

Brefeldin A ist ein Inhibitor der Proteininsertion in die Zellmembran. Es blockiert den Transport von Vesikeln aus dem endoplasmatischen Retikulum. Sobald die Oozyten mit Brefeldin inkubiert wurden, wurden keine Proteine mehr in die Zellmembran eingebaut. Wie in **Abbildung 20** dargestellt, konnte β-Catenin

einen Abfall des Ouabain-abhängigen Stromes - also des Na^+/K^+ -ATPase induzierten Stromes - in Anwesenheit von Brefeldin A nicht verhindern. β -Catenin hat also keinen Einfluss auf die Entfernung der Na^+/K^+ -ATPase aus der Zellmembran.

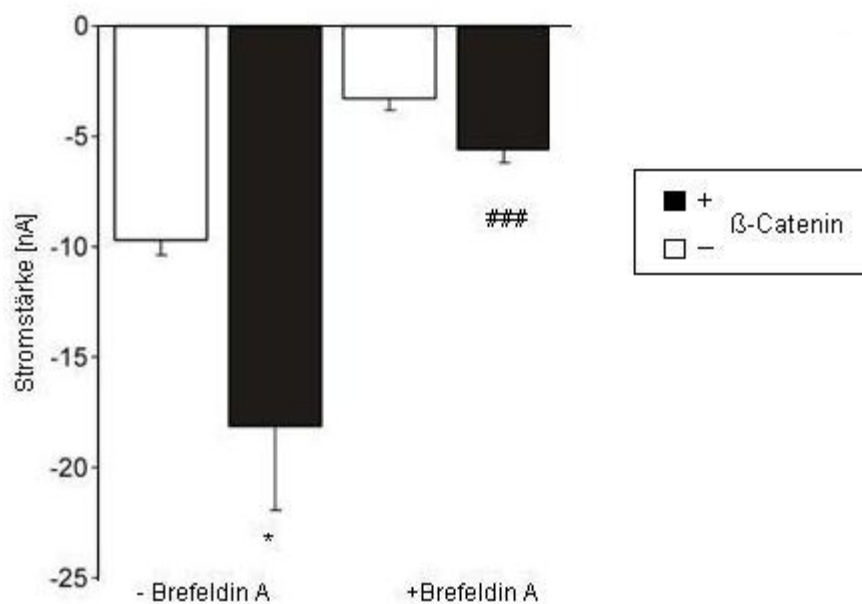


Abbildung 20: Die Expression von β -Catenin hat keinen Einfluss auf die Entfernung der Na^+/K^+ -ATPase aus der Membran von Xenopus-Oozyten.

Arithmetische Mittelwerte + SEM (n = 9-11) des Ouabain-gehemmten Stromes. Die weißen Balken zeigen die Höhe der Ströme von Oozyten, in die lediglich DEPC-Wasser injiziert wurde. Die schwarzen Balken zeigen die Ströme über die Zellmembran von Oozyten, in die cRNA-codierend für β -Catenin injiziert wurde. Die Oozyten der linken beiden Balken wurden nicht zuvor mit Brefeldin A behandelt (- Brefeldin A). Die rechten beiden Balken bilden die Messwerte für Oozyten ab, die zuvor mit Brefeldin A behandelt wurden (+ Brefeldin A).

* steht für signifikante Differenz zu DEPC-Wasser-injizierten Oozyten (ANOVA; p < 0,05)

steht für signifikante Differenz zu Zellen ohne vorherige Behandlung mit Brefeldin A (t-Test; P < 0,001).

3.2 Die Stimulation der SGLT1-Aktivität durch β -Catenin

3.2.1 Untersuchungen mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Um den Einfluss von β -Catenin auf den Na^+ -gekoppelten Glukosetransporter SGLT1 zu erforschen, wurde dieser ebenfalls in *Xenopus laevis*-Oozyten mit oder ohne β -Catenin exprimiert.

Der glukoseinduzierte Strom war in Oozyten, die zusätzlich zu SGLT1 auch β -Catenin exprimierten, signifikant höher als in Oozyten, welche nur SGLT1 exprimierten und in welche zusätzlich DEPC-Wasser injiziert wurde (**s. Abb. 21**).

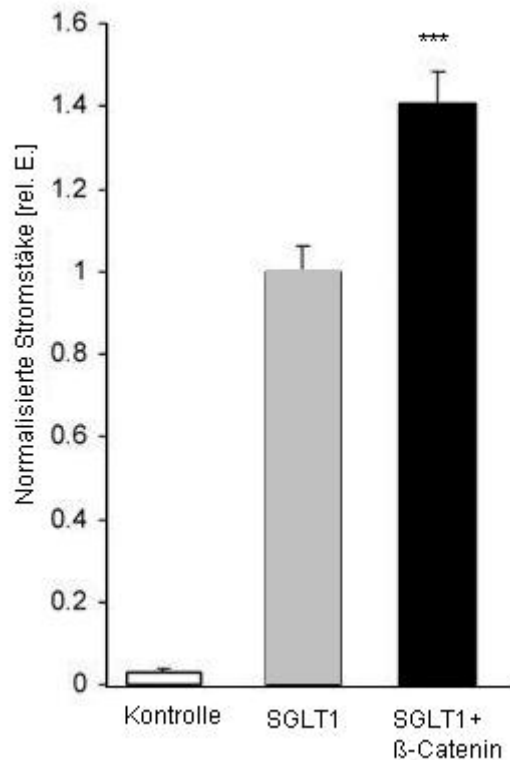


Abbildung 21: Die Erhöhung des glukoseabhängigen SGLT1-Stromes durch β-Catenin.

Arithmetische Mittelwerte + SEM (n = 21-28) des glukoseinduzierten, transmembranösen Stromes über die Zellmembran von Oozyten, in die DEPC-Wasser (Kontrolle) sowie DEPC-Wasser und cRNA codierend für SGLT1 (SGLT1) injiziert wurde sowie über die Zellmembran von Oozyten, in die jeweils cRNA codierend für SGLT1 und β-Catenin (SGLT1 + β-Catenin) injiziert wurde.

*** steht für eine signifikante Differenz gegenüber Oozyten, welche SGLT1 ohne β-Catenin exprimierten.

(ANOVA; P < 0,5).

Um zu ermitteln, ob β-Catenin den Na⁺-abhängigen Glukosetransport anderweitig als über den Na⁺-abhängigen Glukosetransporter SGLT1 stimuliert, wurden Oozyten mit cRNA codierend für β-Catenin ohne cRNA codierend für den SGLT1 injiziert. Diese wurden mit Oozyten verglichen, in die nur DEPC-Wasser injiziert wurde sowie mit Oozyten, in die SGLT1-cRNA injiziert wurde. Die Expression von β-Catenin in Oozyten, die nicht zusätzlich SGLT1 exprimierten, zeigte keine signifikante Erhöhung des glukoseinduzierten Stromes (**s. Abb 22**).

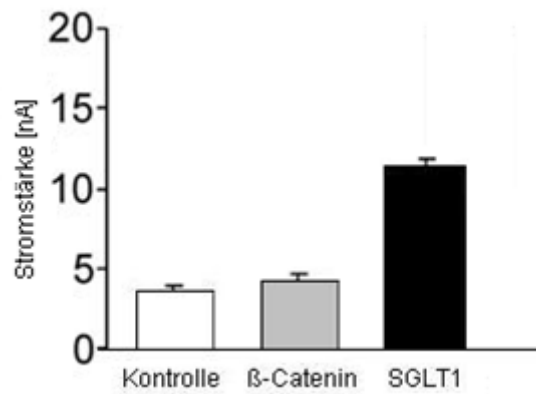


Abbildung 22: β-Catenin reguliert den Na⁺-abhängigen Glukosetransport.

Arithmetische Mittelwerte + SEM (n = 20-30) des glukoseinduzierten Stromes in Oozyten injiziert mit DEPC-Wasser (Kontrolle), mit DEPC-Wasser und cRNA codierend für SGLT1 (SGLT1) sowie mit DEPC-Wasser und cRNA codierend für β-Catenin (β-Catenin).

Zur Untersuchung, ob der Einfluss von β-Catenin auf die Aktivität des Na⁺-gekoppelten Glukosetransportes über SGLT1 auf Transkriptionsebene abläuft, wurden Oozyten mit dem Transkriptioninhibitor Actinomycin D behandelt. Die Zellen wurden dazu nach Injektion der cRNA über 3 Tage in ND96-Aufbewahrungslösung, die mit Actinomycin D (10 μM) versetzt wurde, gegeben. Bei den darauffolgenden TEVC-Messungen konnte festgestellt werden, dass Actinomycin D keinen signifikanten Einfluss auf den erhöhten glukoseinduzierten Strom über SGLT1 bei Koexpression von β-Catenin und SGLT1 hatte (**s. Abb 23**).

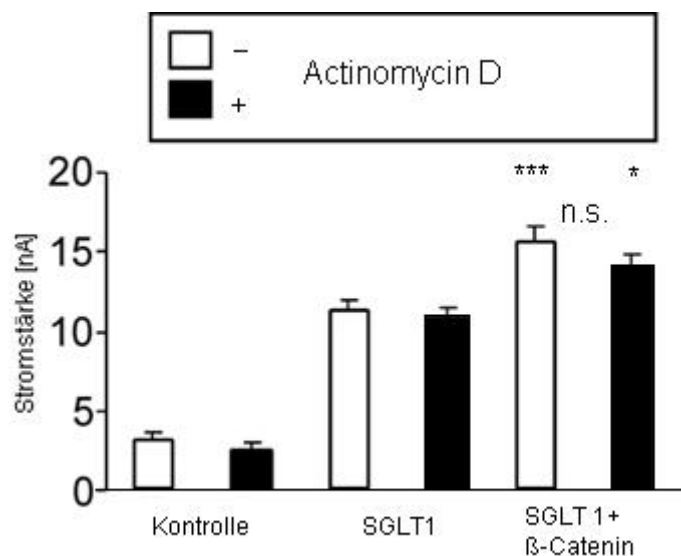


Abbildung 23: Erhöhung des glukoseabhängigen SGLT1-Stromes durch β-Catenin.

Arithmetische Mittelwerte + SEM (n = 20-30) des glukoseinduzierten, transmembranösen Stromes über die Zellmembran von Oozyten, in die DEPC-Wasser (Kontrolle) sowie DEPC-Wasser und cRNA codierend für SGLT1 (SGLT1) injiziert wurde sowie über die Zellmembran von Oozyten, in die jeweils cRNA codierend für SGLT1 und β-Catenin (SGLT1 + β-Catenin) injiziert wurde.

Die weißen Balken stellen die Messwerte für Oozyten dar, welche nicht mit Actinomycin vorbehandelt wurden. Die schwarzen Balken bilden die Messwerte für Zellen ab, welche mit 50 μM Actinomycin über 3 Tage vorbehandelt wurden.

* ; *** steht für eine signifikante Differenz von Oozyten, welche SGLT1 und β-Catenin exprimierten, verglichen mit Oozyten, die SGLT1 ohne β-Catenin exprimierten (ANOVA; P < 0,05, P < 0,001).

n.s.= nicht signifikanter Unterschied von SGLT1 und β-Catenin exprimierenden Oozyten, welche nicht mit Actinomycin vorbehandelt wurden, im Vergleich zu Oozyten, die mit Actinomycin vorbehandelt wurden.

Um die Möglichkeit zu berücksichtigen, dass der erhöhte glukoseabhängige SGLT1-Strom in Oozyten, welche neben dem SGLT1 auch β-Catenin exprimierten, durch die ebenfalls durch β-Catenin erhöhte Na⁺/K⁺-ATPase-Aktivität zustande kommt, wurden die glukoseinduzierten Ströme mit und ohne den Na⁺/K⁺-ATPase-Hemmer Ouabain (1 mM) gemessen. Sollte der Na⁺-abhängige Glukosetransport über SGLT1 durch die durch β-Catenin erhöhte Aktivität der Na⁺/K⁺-ATPase entstehen, würde sich eine Absenkung der durch

β -Catenin erhöhten SGLT1-Aktivität zeigen.

Wie in **Abbildung 24** zu sehen ist, flachte Ouabain den β -Catenin-Effekt auf die SGLT1 Aktivität ab. Der absolute β -Catenin-stimulierte SGLT1-Strom ohne Ouabain lag bei 83,6 +/- 12,9 nA (n = 7 Oozytenchargen). In Anwesenheit von 1 mM Ouabain lag der β -Catenin-stimulierte SGLT1-Strom bei 78,1 +/- 12,4 nA (n = 7 Oozyten- chargen) (p < 0,05; gepaarter T-Test).

Der erhöhte glukoseabhängige SGLT1-Strom ist somit partiell - aber nicht vollständig - durch den aktivitätssteigernden Effekt von β -Catenin auf die Na⁺/K⁺-ATPase zu erklären (**s. Abb. 24**).

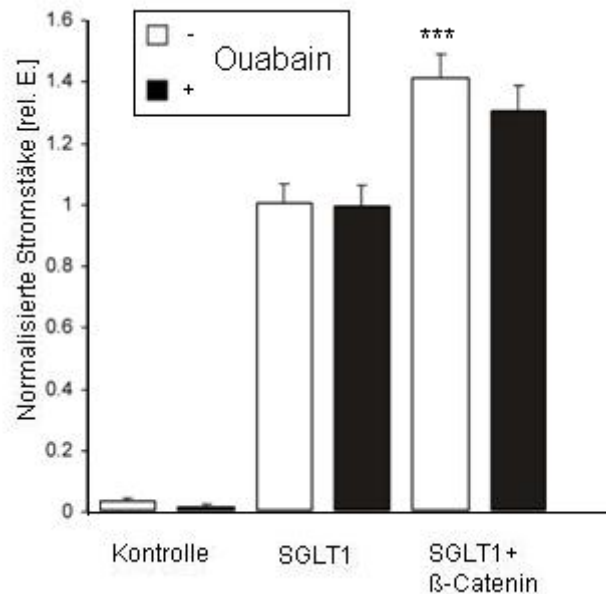


Abbildung 24: Der Einfluss von Ouabain auf die Erhöhung des glukoseabhängigen SGLT1-Stromes durch β-Catenin.

Normalisierte Stromstärke + SEM (n = 21-28) des glukoseinduzierten, transmembranösen Stromes über die Zellmembran von Oozyten, in die DEPC-Wasser (Kontrolle) sowie DEPC-Wasser und cRNA codierend für SGLT1 (SGLT1) injiziert wurde sowie über die Zellmembran von Oozyten, in die jeweils cRNA codierend für SGLT1 und β-Catenin (SGLT1 + β-Catenin) injiziert wurde.

Die weißen Balken stellen die Messwerte für Oozyten dar, welche nicht mit Ouabain behandelt wurden. Die schwarzen Balken bilden die Messwerte für Oozyten ab, welche mit Ouabain behandelt wurden.

*** steht für eine signifikante Differenz der Messwerte von Oozyten, die SGLT1 und β-Catenin exprimierten, zu den Messwerten von Oozyten, die SGLT1 ohne β-Catenin exprimierten (ANOVA, P < 0,001).

3.2.2 Immunhistochemie

Um die Expression des Na⁺-gekoppelten Glukosetransporters SGLT1 in der Zellmembran der *Xenopus laevis*-Oozyten zu bestimmen, wurden ein Chemilumineszenz-Assay und die konfokale Mikroskopie angewendet.

Es wurden Oozyten, in die nur DEPC-Wasser injiziert wurde, mit Oozyten verglichen, die nur SGLT1 ohne β -Catenin oder SGLT1 mit β -Catenin exprimierten. Bei Oozyten, in die lediglich DEPC-Wasser injiziert wurde, konnte eine geringe Chemilumineszenz festgestellt werden. Dies könnte beispielsweise auf eine unspezifische Eigenfluoreszenz der Oozyten zurückzuführen sein. In Oozyten, in die cRNA codierend für SGLT1 und DEPC-Wasser injiziert worden war, konnte eine deutlich höhere Chemilumineszenz gemessen werden als in Oozyten, in die nur DEPC-Wasser injiziert worden war. In zuvor mit cRNA codierend für SGLT1 und β -Catenin-injizierten Oozyten wurde eine ca. 1,4-fache höhere Chemilumineszenz verglichen mit Oozyten ohne injizierte cRNA codierend für β -Catenin gemessen. (s. **Abb 25**).

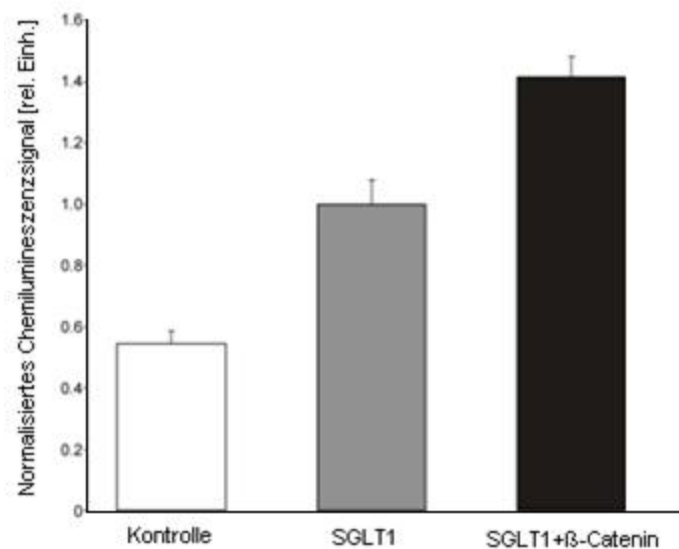


Abbildung 25: Eine Koexpression von β -Catenin und SGLT1 erhöht die Chemilumineszenz in der Zellmembran von Xenopus-Oozyten für markiertes SGLT1-Protein.

Chemilumineszenz-Assay zur Bestimmung der SGLT1-Membranexpression. Normalisierte Werte + SEM der SGLT1-abhängigen Chemilumineszenz in Xenopus-Oozyten injiziert mit DEPC-Wasser (Kontrolle), injiziert mit cRNA codierend für SGLT1 und DEPC-Wasser (SGLT1) sowie injiziert mit cRNA codierend für SGLT1 und β -Catenin (SGLT1 + β -Catenin).

Es wurden 3 unterschiedliche Oozytenchargen zur Messung verwendet.

Bei der konfokalen Mikroskopie konnte ebenfalls ein Anstieg an SGLT1-Protein in der Zellmembran von *Xenopus laevis*-Oozyten beobachtet werden. In Oozyten, die nur mit DEPC-Wasser injiziert wurden, konnte kein SGLT1-Protein in der Zellmembran festgestellt werden. Wurde den Oozyten, die cRNA codierend für SGLT1 und DEPC-Wasser erhalten hatten, nur der primäre Antikörper zugesetzt, konnte keine Fluoreszenz festgestellt werden. In Zellen, in welche cRNA codierend für SGLT1 und DEPC-Wasser injiziert wurde, konnte nach Zugabe des primären und sekundären Antikörpers eine deutliche Fluoreszenz ermittelt werden. In Oozyten, welche SGLT1 und β -Catenin exprimierten, wurde eine höhere SGLT1-Fluoreszenz beobachtet als in Oozyten, welche nur SGLT1 exprimierten (**s. Abb 26**).

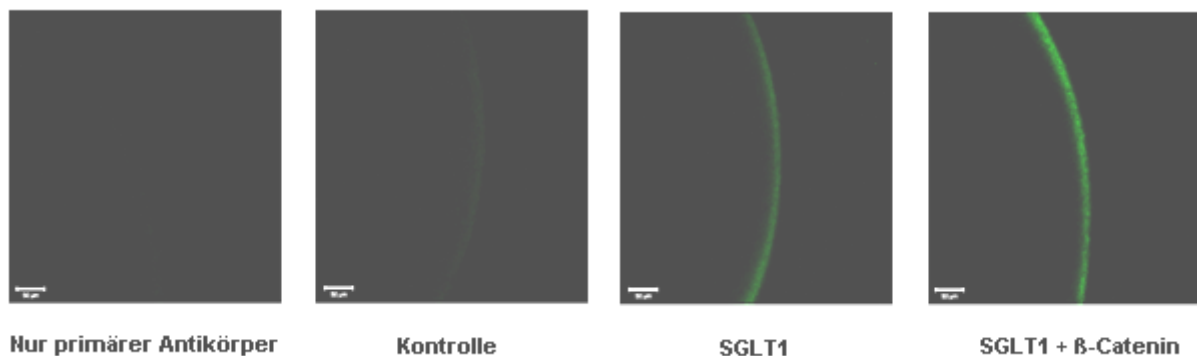


Abbildung 26: β -Catenin erhöht die Expression des SGLT1-Proteins in der Zellmembran von *Xenopus laevis*-Oozyten.

Konfokale Mikroskopie von *Xenopus* Oozyten injiziert mit cRNA codierend für SGLT1 und DEPC- Wasser, jedoch ohne Zugabe des sekundären Antikörpers (nur primärer Antikörper) sowie bei Oozyten, in welche lediglich DEPC-Wasser injiziert wurde (Kontrolle) und von Oozyten, in welche cRNA codierend für SGLT1 und DEPC-Wasser injiziert wurde (SGLT1) sowie von Oozyten, welche SGLT1 und β -Catenin exprimierten (SGLT1 + β -Catenin).

Es wurden zwei unterschiedliche Oozytenchargen analysiert.

3.3 Stimulation des Aminosäuretransporters SN1 durch die GSK3 β

3.3.1 Untersuchungen mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

In Messungen zur Untersuchung der Regulation der Aktivität des Aminosäuretransportes über den Glutamintransporter SN1 wurden Oozyten des *Xenopus laevis* mit der TEVC Methode untersucht. Es wurden Oozyten, die nur SN1 exprimierten, mit Oozyten verglichen, die SN1 zusammen mit der GSK3 β exprimierten.

Um die Funktion der Expression von cRNA codierend für den SN1 zu untersuchen, wurden Oozyten, die mit cRNA von SN1 injiziert worden waren, mit Oozyten verglichen, in die nur DEPC-Wasser injiziert worden war. Nach Zugabe von Glutamin zu Oozyten, die SN1 exprimierten, konnte ein Einwärtsstrom gemessen werden. Im Vergleich dazu konnte in Oozyten, in welche anstatt von cRNA codierend für SN1 nur DEPC-Wasser injiziert wurde, nach Zugabe von Glutamin kein transmembranöser Strom gemessen werden (**s. Abb. 27 und 28**).

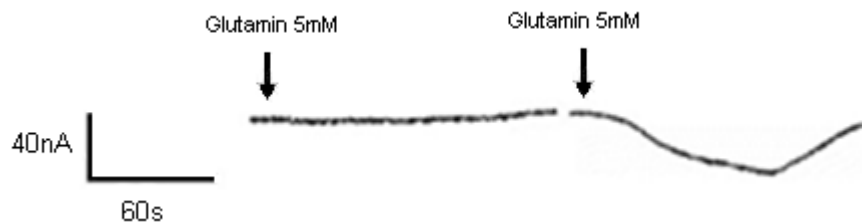


Abbildung 27: Originalspuren von Messungen der Ströme über die Oozytenmembran im Spannungsklemmen-Modus.

Die linke Spur zeigt den Stromfluss über die Oozytenmembran von Oozyten, in welche DEPC-Wasser anstelle von cRNA codierend für SN1 injiziert wurde, nach der Zugabe von Glutamin (5 mM). Die rechte Spur zeigt den Stromverlauf über die Oozytenmembran nach Zugabe von Glutamin (5 mM) von Oozyten, in welche cRNA von SN1 injiziert wurde.

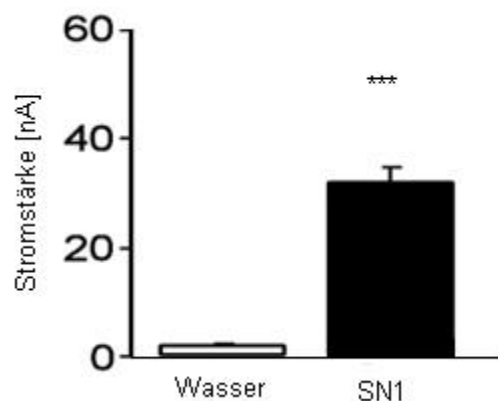


Abbildung 28: Glutamininduzierte Ströme in SN1 exprimierenden Oozyten.

Arithmetische Mittelwerte + SEM (10-12) der glutamininduzierten (5 mM) Ströme über die Zellmembran von *Xenopus laevis*-Oozyten, in die DEPC-Wasser (Wasser) injiziert worden war, im Vergleich zu Oozyten, in die 25 ng cRNA codierend für SN1(SN1) injiziert worden war.

*** zeigt einen signifikanten Unterschied von Oozyten, welche nicht SN1 exprimierten, verglichen mit Oozyten, welche SN1 exprimierten an ($p < 0,01$).

Zur Untersuchung der Regulation der Aktivität des Aminosäuretransportes über den Glutamintransporter SN1 durch die GSK3 β wurde in Oozyten, in welche

cRNA codierend für SN1 injiziert wurde, zusätzlich cRNA codierend für die GSK3 β injiziert. Bei den darauffolgenden TEVC-Messungen konnte eine signifikante Erhöhung des transmembranösen Stromes in Oozyten, die parallel zu SN1 die GSK3 β exprimierten, gegenüber Oozyten, die nur den Glutamintransporter SN1 exprimierten, gemessen werden. In originalen TEVC-Stromverlaufskurven dieser SN1-Messungen kann der Unterschied in der Höhe des transmembranösen Stromes gesehen werden (s. **Abb. 29**). Die absolute Höhe des Stromes ist in **Abbildung 30** grafisch dargestellt.



Abbildung 29: Originalspuren von Messungen der Ströme über die Oozytenmembran im Spannungsklemmen-Modus.

Die linke Spur bildet den Verlauf der Stromkurve von Oozyten, in welche cRNA von SN1 und DEPC-Wasser injiziert wurde, nach Zugabe von Glutamin (5 mM) ab. Die rechte Spur stellt den Verlauf der transmembranösen Ströme von Oozyten dar, in welche jeweils cRNA codierend für SN1 und GSK3 β injiziert wurde.

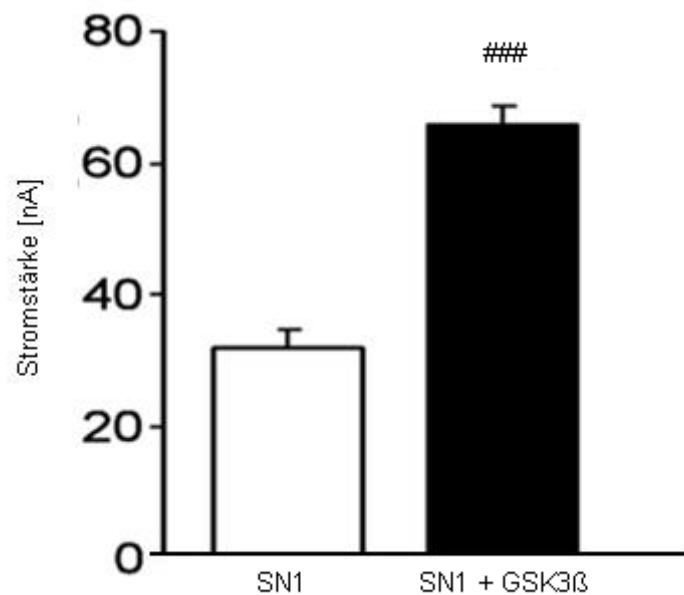


Abbildung 30: Die GSK3β und ihre Auswirkung auf die Aktivität glutamininduzierter Ströme in SN1 exprimierenden Oozyten.

Arithmetische Mittelwerte + SEM (n 10-12) der Glutamin- (5 mM) induzierten Ströme über die Membran von *Xenopus laevis*-Oozyten injiziert mit cRNA codierend für SN1 (25 ng) und DEPC-Wasser (SN1). Der rechte schwarze Balken (SN1 + GSK3β) stellt die Höhe der transmembranösen Ströme von Oozyten dar, in welche cRNA jeweils codierend für SN1 (25 ng) und GSK3β (5 ng) injiziert wurde.

zeigt einen signifikanten Unterschied von Oozyten, injiziert mit DEPC-Wasser und SN1, im Vergleich zu Oozyten, injiziert mit cRNA codierend für SN1 und GSK3β, an ($p < 0,01$).

Da die GSK3β die Aktivität der glutamininduzierten, transmembranösen Ströme auch anderweitig als über den Glutamintransporter SN1 erhöhen könnte, wurde versuchsweise die GSK3β ohne den Glutamintransporter SN1 in Oozyten exprimiert. Hätte sich bei diesen TEVC-Messungen im Vergleich zu den nur mit DEPC-Wasser injizierten Oozyten ein erhöhter glutamininduzierter, transmembranöser Strom gezeigt, hätte angenommen werden können, dass die GSK3β unabhängig vom Glutamintransporter SN1 den Glutamintransport über die Oozytenmembran erhöht.

Es wurden dazu *Xenopus laevis*-Oozyten, die die GSK3β exprimierten, mit

Oozyten verglichen, in die DEPC-Wasser injiziert worden war. Bei diesen TEVC-Messungen konnte jedoch kein signifikanter Anstieg von glutamininduzierten, transmembranösen Strömen gemessen werden. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die GSK3 β den glutamininduzierten, transmembranösen Strom über die Regulation der Aktivität des SN1 erhöht. (s. **Abb 31 und 32**).

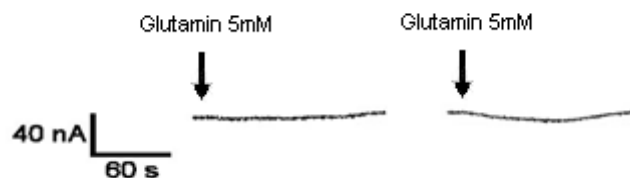


Abbildung 31: Originalspuren von Messungen der glutamininduzierten Ströme über SN1 der Oozytenmembran im Spannungsklemmen-Modus.

Die linke Spur zeigt den Stromfluss über die Oozytenmembran von Oozyten, in welche DEPC-Wasser anstelle von cRNA codierend für GSK3 β injiziert wurde. Die rechte Spur zeigt den Stromverlauf über die Oozytenmembran von Oozyten, in welche cRNA von GSK3 β injiziert wurde, jeweils nach Zugabe von Glutamin (5 mM).

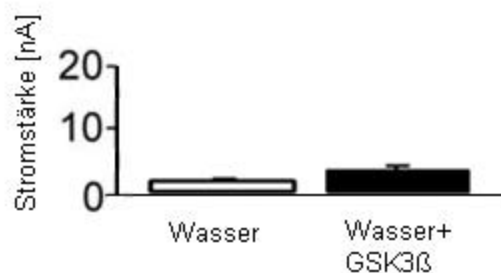


Abbildung 32: Glutamininduzierte Ströme in GSK3 β exprimierenden Oozyten.

Arithmetische Mittelwerte + SEM (n 10-12) der glutamininduzierten (5 mM) Ströme über die Zellmembran von Oozyten injiziert mit DEPC-Wasser (Wasser). Der schwarze Balken (Wasser + GSK3 β) zeigt die Höhe der transmembranösen Ströme von Oozyten, welche mit cRNA codierend für GSK3 β (5 ng) injiziert wurden.

3.3.2 Ussingkammerexperimente

Der Einfluss der GSK3 auf den allgemeinen Aminosäuretransport im Dünndarm von Mäusen wurde durch Ussingkammerexperimente untersucht. Hierzu wurden die weiter oben erwähnten jejunalen Segmente von PKB/SGK-resistenten GSK3-Knockin-Mäusen (GSK3^{Ki}) sowie die von ihren Wildtypgeschwistern (GSK3^{WT}) verwendet.

Vor Beginn jeder Messung wurden die transepitheliale Potentialdifferenz sowie der transepitheliale Widerstand der jeweiligen jejunalen Darmsegmente der GSK3^{Ki}- und der GSK3^{WT}- Mäuse gemessen und anschließend verglichen.

Wie in **Tabelle 12** zu erkennen, unterschieden sich die jeweiligen Messwerte der von GSK3^{Ki}- und GSK3^{WT}-Mäusen stammenden Darmsegmente nicht signifikant voneinander (**s. Tab 12**).

Tabelle 12: Die Potentialdifferenz und der Widerstand des jejunalen Gewebes der GSK3^{Ki}- und GSK3^{WT}-Mäuse in der Ussingkammer vor Versuchsbeginn unterscheiden sich nicht signifikant.

GSK 3 ^{Ki}		GSK 3 ^{WT}	
Vt (n = 8)	$\Omega \cdot \text{cm}^2$ (n=8)	Vt (n = 10)	$\Omega \cdot \text{cm}^2$ (n = 10)
0,90 +/- 0.04 mV	6,94 +/- 0,33 $\Omega \cdot \text{cm}^2$	0,89 +/- 0,03 mV	6,85 +/- 0,22 $\Omega \cdot \text{cm}^2$

Um die Osmolarität zu erhalten, wurde bei den Ussingkammermessungen der Darmsegmente beim Hinzufügen der Aminosäuren jeweils in äquivalenter

Menge weniger Mannitol zur eingefüllten Flüssigkeit der beiden Kammern beigegeben.

Die Zugabe von L-Phenylalanin, L-Leucin, L-Glutamin, L-Prolin oder L-Tryptophan (jeweils 5 mM) erzeugte einen Spannungsabfall (ΔV_t) auf der luminalen Seite der Ussingkammer. Der transepitheliale Widerstand des Darmes änderte sich dabei nicht signifikant. ΔV_t war im jejunalem Gewebe der GSK 3^{Ki}-Mäuse signifikant höher als in GSK 3^{WT} Gewebe.

Mit Hilfe ΔV_t und R_t konnte der aminosäureinduzierte Strom errechnet werden. Auch dieser war in jejunalem Gewebe der GSK3^{Ki}-Mäuse signifikant höher als im GSK3^{WT} Gewebe (s. Abb. 33 und 34).

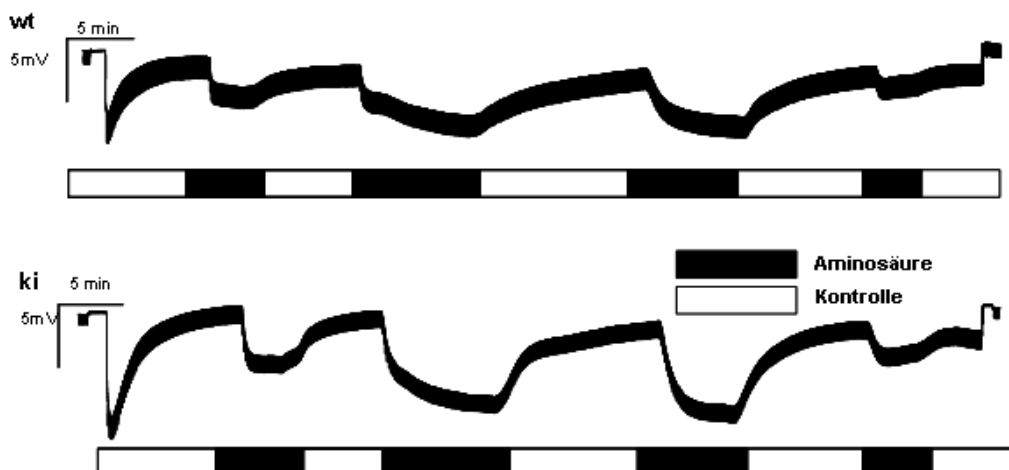


Abbildung 33: Originalspuren des Spannungsverlaufes über jejunale Darmsegmente der Maus nach Aminosäurezugabe in der Ussingkammer.

Originalspuren aus den Ussingkammerexperimenten. Gezeigt wird der Effekt von 5 mM Aminosäure (angezeigt durch die schwarzen Balken unter den Kurven) auf die transepitheliale Potentialdifferenz .

Die obere Spur zeigt die Höhe der Potentialdifferenz bei jejunalem Gewebe der GSK3^{WT} Maus. Die untere Spur zeigt die Höhe der Potentialdifferenz des jejunalen Gewebes der GSK3^{Ki} Maus.

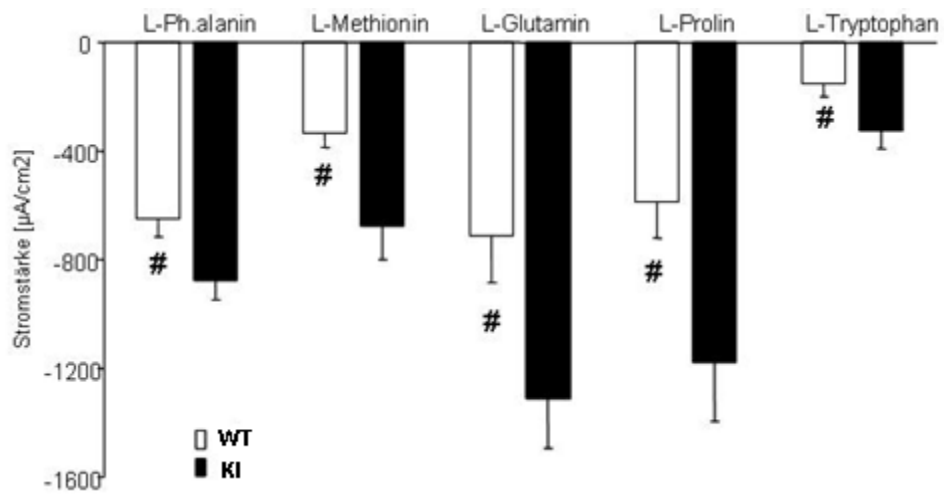


Abbildung 34: Aminosäureinduzierter, transepithelialer Strom in jejunalen Darmsegmenten der Maus.

Arithmetische Mittelwerte + SEM (n = 6-10) der L-Phenylalanin-, L-Leucin-, L-Glutamin-, L-Prolin- und L-Tryptophaninduzierten Ströme über jejunale Darmsegmenten der Maus. Verglichen wurden jejunale Segmente von GSK3^{WT}- (weiße Balken) mit GSK3^{KI}- (schwarze Balken) Mäusen.

bedeutet signifikanter Unterschied (p<0,05) zwischen GSK3^{WT}- und GSK3^{KI}-Mäusen.

4. Diskussion



4.1 Fehlerdiskussion

4.1.1 Herstellung der chemischen Lösungen

Alle Lösungen wurden in oben bereits erwähnten Konzentrationen angemischt. Wurde eine Lösung regelmäßig und in größerer Menge benötigt, wurde eine Stammlösung in höherer Konzentration angemischt und bei Bedarf dementsprechend mit destilliertem Wasser verdünnt. Die Verwendung einer Stammlösung ist als ein Kompromiss zwischen Arbeitsaufwand und Genauigkeit der entstehenden benötigten Lösung anzusehen. Je höher die Konzentration der Stammlösung ist, umso mehr könnten etwaige Pipettierungenauigkeiten zum Tragen kommen. Es wurde deswegen auf genauestes Wiegen und Abmessen der benötigten Substanzen geachtet.

Die entstandenen Lösungen wurden, je nach chemischer Eigenschaft bei Raumtemperatur, im Kühlschrank bei 15°C, im Kühlschrank bei 7°C oder in der Gefriertruhe bei -20°C aufbewahrt. Jede Lösung wurde kurz vor dem Versuch neu angemischt, um chemische Veränderungen zu vermeiden. Ebenso wurde jede Lösung nach dem Anmischen auf pH-Wert und Osmolarität kontrolliert.

4.1.2 Geräte

4.1.2.1 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Die Apparatur zum Messen der transmembranösen Ströme wurde durch einen Faraday'schen Käfig von elektrischen Störungen abgeschirmt. Zudem wurden schwere, geerdete Messtische verwendet, um einen möglichen Einfluss von Vibrationen des Untergrundes von der Messapparatur abzuschirmen bzw. zu minimieren.

Ein zu hoher Widerstand der Messelektroden konnte durch wiederholte Versilberung der Elektroden behoben werden. Entstand ein zu hoher Widerstand durch ein Verstopfen der Glaskapillaren mit Zellresten, wurden die Glaskapillaren ausgetauscht. Schwankungen des Elektrodenwiderstands wurden vor und nach der Messung regelmäßig kontrolliert.

4.1.2.2 Ussingkammer

Da elektrische Widerstände die gemessenen Ströme beeinflussen, ist es wichtig zu berücksichtigen, dass unterschiedliche Bereiche der Messapparatur Einfluss auf den Gesamtwiderstand haben. Dazu gehören die Widerstände der Elektroden vor allem am Übergang zur Flüssigkeit sowie der Eigenwiderstand der Flüssigkeit, mit dem die Ussingkammer befüllt ist. Um diese Einflüsse möglichst gering zu halten, wurden vor jeder Messung Leerlaufmessungen durchgeführt. Die Widerstandswerte der Leerlaufmessungen wurden bei einer Messung mit Gewebe berücksichtigt.

Zudem musste beim Vergleich zweier Gewebe beim Einsetzen des zweiten Gewebes auf möglichst exakt gleiche Bedingungen beim Wiederbefüllen der Ussingkammer geachtet werden. So wurden externe Einflüsse, wie unterschiedliche Zusammensetzung der Flüssigkeiten oder Temperaturunterschiede, möglichst gering gehalten.

4.1.3 Auswertung der Messergebnisse der TEVC-Messungen

Während der Untersuchungen zeigte sich, dass unterschiedliche Einflüsse während des Messvorgangs Einfluss auf die Eigenschaften der elektrischen Ströme über die Oozytenmembran hatten. Einerseits hat der Zustand der Oozytenmembran Einfluss auf die Messvorgänge, andererseits kann auch die Flussrate der Badlösung derartige Einflüsse ausüben. Es wurde deshalb ein

einstellbarer mechanischer Flussbegrenzer in die Zuflussleitung der Badlösung eingebaut und der Zufluss auf konstant 20 ml/min begrenzt.

Der Zustand der Oozytenmembran hatte einen erheblichen Einfluss auf die Qualität der Messungen. Defekte der Zellmembran machten sich durch Leckströme im Stromklemmen-Modus in Form einer zu geringen Spannung über die Zellmembran bemerkbar. Eine Spannung unter 20 mV zwischen Oozytenzytoplasma und Badlösung führte zum Aussortieren dieser Oozyten. Zudem wurde der Zustand jeder einzelnen Zelle vor jedem Messvorgang über ein Binokular kontrolliert. Flecken, Verfärbungen oder sonstige Unregelmäßigkeiten der Zellmembran führten ebenfalls zum Aussortieren der Oozyten. Zusätzlich wurde auf eine ausreichende Durchspülung der zuführenden Schläuche der Badlösung vor und nach jeder Messung geachtet, um eine Verunreinigung des Systems mit Chemikalien aus vorangegangenen Messungen auszuschließen.

Außerdem wurde mit der Zugabe der entsprechenden Aktivierungslösung - im Falle der SGLT1 Messungen war dies die ND96-Lösung+Glukose - und somit mit den Messungen des transmembranösen Stromes über die Oozytenmembran erst begonnen, wenn die Stromkurve in einem stabilen Zustand („steady state“) war (**s. Abb. 35**).

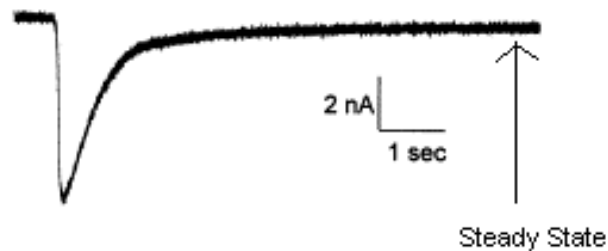


Abbildung 35: Original TEVC-Spur vor Zugabe von Glukose bei Messung des Na⁺-abhängigen Glukosetransportes über den SGLT1.

Originalspur einer elektrophysiologischen Messung des Na⁺-abhängigen Glukosetransportes über den SGLT1 nach Umschaltung vom Stromklemmen-Modus in den Spannungsklemmen-Modus: Erst nach dem Erreichen eines stabilen Zustandes der Stromkurve im Bereich „steady state“ wurde Glukose zugegeben und die Messung begonnen.

4.1.4 Injektion der cRNA und Präparation der Oozyten

Die verwendeten Oozyten wurden, wie oben bereits erwähnt, dem afrikanischen Krallenfrosch *Xenopus laevis* entnommen. Da jedoch die einzelnen Frösche teilweise in verschiedenen Lebensphasen waren, unterschieden sich die Oozyten teilweise in ihrer Qualität. Es wurde bei der Entnahme und Präparation der Oozyten auf ein standardisiertes Vorgehen geachtet. Bei offensichtlich schlechter Qualität der Oozyten wurden diese verworfen. Durch dieses Vorgehen konnten Einflüsse durch schlechte Qualität und unterschiedliche Verarbeitung der Oozyten minimiert werden.

Jedem Frosch wurden in seiner Lebenszeit bis zu dreimal - in Abständen von jeweils ca. einem Monat - Oozyten entnommen. Danach wurde der Frosch unter Betäubung getötet. Die Qualität der Oozyten unterschied sich bei der ersten Entnahme teilweise deutlich von der zweiten oder dritten Entnahme. Es wurde deshalb darauf geachtet, dass der o.g. Zeitraum von ca. einem Monat

zwischen den einzelnen Entnahmen eingehalten wurde. Dadurch verbesserte sich die Qualität der Oozyten der zweiten oder dritten Entnahme deutlich.

Auch der Expressionsgrad der injizierten cRNA in unterschiedlichen Oozytenchargen schwankte teilweise erheblich. Ursachen dafür waren eine Streuung der tatsächlich injizierten cRNA, die Qualität der cRNA, die Qualität der endogenen Expressionssysteme der jeweiligen Oozyten und das Ausmaß der Verletzung der Oozyten beim Einstich der Glaskapillaren zur Injektion. Diese Unterschiede wurden durch eine standardisierte Vorgehensweise bei der Bearbeitung der Oozyten verringert. Zudem wurde jedes Experiment mehrfach wiederholt, um die qualitative Übereinstimmung und Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

4.2 Ergebnisdiskussion

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen von β -Catenin auf die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase und des Na^+ -gekoppelten Glukosetransportes über den SGLT1 sowie die Regulation des Aminosäuretransportes über SN1 durch die GSK3 β untersucht. Hierfür wurde das bereits seit langem etablierte Expressionssystem der *Xenopus laevis*-Oozyten in Kombination mit der TEVC-Methode angewendet. Zudem wurde mit Hilfe der Immunzytochemie die Menge an SGLT1-Protein in der Zellmembran der Oozyten unter Einfluss von β -Catenin gemessen. Hierbei wurde eine komplett neue Funktion von β -Catenin in der Regulation des transmembranösen Transportes herausgearbeitet.

Aufgrund der Untersuchungen kann man annehmen, dass β -Catenin ein starker Stimulator sowohl der Na^+/K^+ -ATPase als auch des Na^+ -gekoppelten Glukosetransportes durch den SGLT1 ist.

Außerdem wurde die Regulation der Aktivität des Aminosäuretransporters SN1 durch die GSK3 β untersucht. Dabei wurde auch mit dem Expressionssystem der *Xenopus laevis*-Oozyten in Kombination mit der TEVC-Methode gearbeitet. Darüber hinaus wurde die Regulation der Aktivität des Aminosäuretransportes

über jejunales Dünndarmgewebe von GSK3 β ^{KI}- mit GSK3 β ^{WT}-Mäusen mit Hilfe der Ussingkammer verglichen.

Bei beiden im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Untersuchungen wurde ein stimulierender Einfluss der GSK3 β auf die Aktivität des Aminosäuretransporters SN1 und den Aminosäuretransport über jejunale Segmente von PKB/SGK-resistenten GSK3-Knockin-Mäusen erkannt.

4.2.1 Die Regulation Na⁺/K⁺-ATPase-Aktivität durch β -Catenin

In allen eukaryontischen Zellen existiert eine Na⁺/K⁺-ATPase. Da sie elektrogen arbeitet, besteht die Möglichkeit, die transmembranösen Ströme über eine Zellmembran mit Hilfe der TEVC-Methode zu messen. In dieser Arbeit wurde die in den Oozyten endogen exprimierte Na⁺/K⁺-ATPase verwendet. Lediglich β -Catenin wurde als cRNA zugeführt.

Von den sieben existierenden Untereinheiten der Na⁺/K⁺-ATPase werden in den *Xenopus* Oozyten mindestens die α 1-, β 1- sowie β 3-Untereinheiten exprimiert (Crambert G, 2000; Geering K, 1989) (**s. Abb 36**).

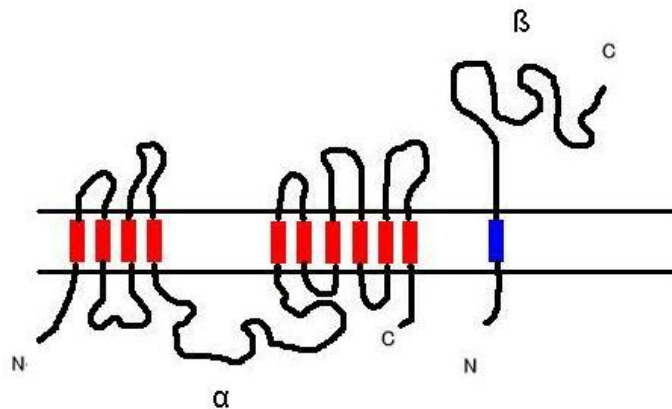


Abbildung 36: Der Aufbau der Na⁺/K⁺-ATPase in der Zellmembran.

Schematischer Aufbau der Na⁺/K⁺-ATPase mit α-Untereinheit (10 Transmembrandomänen) und β-Untereinheit (eine Transmembrandomäne).

Die zum Großteil extrazellulär liegende β-Untereinheit ist für Funktion und Einbau der hauptsächlich intrazellulär liegenden α-Untereinheit verantwortlich (Jaunin P, 1992). Die unterschiedlichen Untereinheiten haben verschiedene Substrataffinitäten und sprechen unterschiedlich auf Na⁺/K⁺-ATPase-Hemmer, wie zum Beispiel Ouabain, an (Therien AG, 1996).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass nach Injektion von cRNA des β-Catenin-Proteins in die Oozyten der Pumpenstrom der endogenen Na⁺/K⁺-ATPase und der Ouabain-gehemmte Strom der endogenen Na⁺/K⁺-ATPase signifikant höher waren als in Oozyten, welche statt cRNA von β-Catenin DEPC-Wasser in der gleichen Menge injiziert bekamen.

Theoretisch kann β-Catenin über eine Hochregulation der SGK1 (Dehner M, 2008; Naishiro Y, 2005) Einfluss auf die Na⁺/K⁺-ATPase haben. Es ist bereits bekannt, dass die SGK1 eine große Anzahl unterschiedlicher Kanäle und membranständiger Transportmechanismen reguliert (Sato JD, 2007; Shaw JR, 2008), unter anderem auch die Na⁺/K⁺-ATPase (Setiawan I, 2002; Verrey F, 2003; Zecevic M, 2004).

Die SGK1 gehört zu den Serin-Threonin-Kinasen. Sie wurde in menschlichen Zellen erstmals bei der Suche nach zellvolumensensitiven Transkripten in einer Hepatomzelllinie (HepG2) entdeckt (Dai F, 1999; Waldegger S, 1997; Waldegger S, 1998).

Die SGK1 wirkt bei der renalen Na^+ -Retention (Fejes-Toth G, 2008; Wulff P, 2002) und beim intestinalen Glukosetransport (Grahammer F, 2006) mit.

β -Catenin hat offensichtlich auch unter Zugabe von Actinomycin D gleichbleibenden Einfluss auf die Na^+/K^+ -ATPase. Actinomycin D bindet an doppelsträngige DNA und verhindert somit die Transkription. Es gehört zur Gruppe der Actinomycine und ist ein Peptidantibiotikum, das aus dem Pilz *Streptomyces Parvulus* gewonnen wird (Gill JE, 1975).

Aufgrund des gleichbleibenden Einflusses von β -Catenin auf die Na^+/K^+ -ATPase unter Hemmung der Transkription durch Actinomycin D kann die Aussage gemacht werden, dass der Effekt der Regulation der Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase durch β -Catenin über posttranskriptionelle Mechanismen und nicht über eine Hochregulation der Transkription der SGK1 erfolgt.

4.2.2 Die Regulation der SGLT1-Aktivität durch β -Catenin

Der Na^+ -abhängige Glukosetransporter SGLT1 ist ein hochaffiner Glukosetransporter, der hauptsächlich im Bürstensaum des Dünndarmes (**s. Abb. 37**) und im proximalen Tubulus der Nieren des Menschen exprimiert wird. Der Glukosetransport ist abhängig vom elektrochemischen Na^+ -Gradienten über die Plasmamembran.

Die Regulation des SGLT1 wurde bereits über die Phosphorylierung durch Proteinkinasen, wie zum Beispiel der Proteinkinase A (PKA) und der Proteinkinase C (PKC), nachgewiesen (Hirsch JR, 1996; Subramanian S, 2009). Eine Hochregulation durch die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) wurde ebenfalls bereits beobachtet (Sopjani M, 2010).

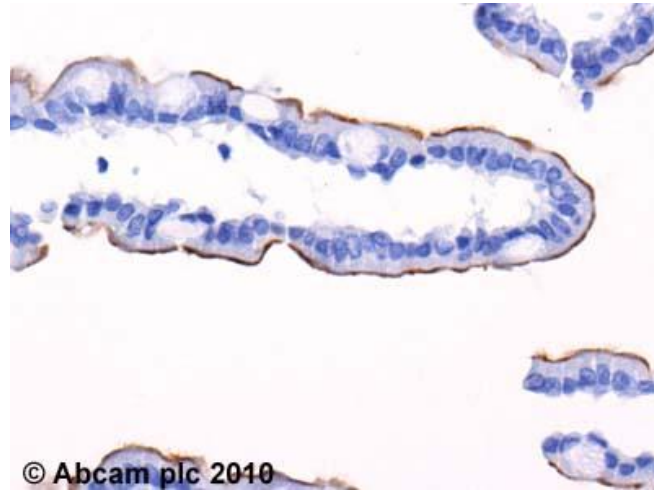


Abbildung 37: Der Na⁺-abhängige Glukosetransporter SGLT1 im Bürstensaum des Dünndarmes.

Mikroskopische Abbildung des Bürstensaumes des Dünndarms markiert mit einem SGLT1-Antikörper (braune Oberfläche).

Quelle *abcam.com*

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass β -Catenin einen stimulierenden Einfluss sowohl auf die Aktivität des SGLT1 als auch auf die Membranexpression des SGLT1 in *Xenopus laevis*-Oozyten hat.

Theoretisch kann β -Catenin über eine Hochregulation der SGK1 (Dehner M, 2008; Naishiro Y, 2005) neben dem hochregulierenden Einfluss auf die Na⁺/K⁺-ATPase auch Einfluss auf den Na⁺-gekoppelten Glukosetransport haben.

Es ist bereits bekannt, dass die SGK1 unter anderem auch in die Regulation des SGLT1 eingreift (Dieter M, 2004). Da β -Catenin auch, wie oben bereits erwähnt, unter Zugabe des Transkriptionshemmers Actinomycin eine Hochregulation der Aktivität der SGLT1 verursacht, kann auch hier gesagt werden, dass posttranskriptionelle Vorgänge beteiligt sein müssen und nicht eine transkriptionelle Hochregulation der SGK1.

Der stimulierende Einfluss von β -Catenin auf den elektrogenen Glukosetransport hängt zumindest teilweise von der Stimulierung der Na⁺/K⁺-

ATPase ab. Diese verringert, wie bekannt, die intrazelluläre Na⁺-Konzentration und erhöht somit den elektrochemischen Gradienten zum Antrieb des Na⁺-gekoppelten Glukosetransportes. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass β-Catenin auch unter Zugabe des Na⁺/K⁺-ATPase-Inhibitors Ouabain den Na⁺-gekoppelten Glukosetransport hochreguliert. Dies zeigt, dass daneben auch andere Mechanismen Einfluss auf die Stimulation des SGLT1 haben müssen.

4.2.3 Die Rolle von β-Catenin für die Regulation des transmembranösen Transports

Eine wichtige Rolle spielt β-Catenin bei der bereits oben erwähnten polyzystischen Nierenerkrankung. Diese entsteht aufgrund einer gestörten Zellproliferation, epithelialer Polarität und eines gestörten mikrotubulären Transports (Benzing T, 2007). Die Krankheit geht mit einer exzessiven Anreicherung von β-Catenin in der Zelle einher (Harris PC, 2008; Simons M, 2006), was mit einer ungebremsten Stimulation der Proliferation durch β-Catenin zusammenhängen kann (Peruzzi B, 2006).

Zudem spielt β-Catenin bei der Bildung der Adherens Junctions - also bei der Bildung von Zell-Zell-Kontakten - eine führende Rolle (Brembeck FH, 2006; Conacci-Sorrell M, 2002).

Außerdem wurde für β-Catenin bereits eine große Anzahl an Interaktionen mit diversen Rezeptorproteinen entdeckt, unter anderem mit Androgenrezeptoren (Yang F, 2002) und dem Her2/Neu (Bonvini P, 2001).

Die vorliegende Arbeit zeigt bezogen auf die Regulation des transmembranösen Transports eine komplett neue Funktion von β-Catenin.

Zusammenfassend kann die Aussage getroffen werden, dass β-Catenin die Na⁺/K⁺-ATPase und den elektrogenen Glukosetransport über den Na⁺-

abhängigen Glukosetransporter SGLT1 stimuliert. Dieser Effekt entsteht vermutlich über eine direkte Interaktion mit den Zellmembranproteinen und ist unabhängig von der genomischen Hochregulation durch die SGK1. Der Effekt von β -Catenin auf SGLT1 ist zumindest teilweise auf die Erhöhung der Triebkraft durch Stimulation der Na^+/K^+ -ATPase zurückzuführen.

4.2.4 Die Regulation der Aktivität von SN1 durch die GSK3 β

Die vorliegende Arbeit weist nach, dass die GSK3 β am epithelialen Aminosäuretransport durch SN1 beteiligt ist. Möglicherweise stimuliert die Kinase auch noch weitere Aminosäuretransporter.

Diese Erkenntnis ist überraschend, da die GSK3 β durch die Proteinkinase B Akt/PKB (Cross HR, 1995; Mora A, 2005; Shaw M, 1997) sowie die Serum- und Glukokortikoid-induzierbare Kinase (SGK) (Sakoda H, 2003; Wyatt AW, 2006) phosphoryliert und dadurch inhibiert wird. Beide Kinasen, einerseits die Proteinkinase B PKB/Akt und andererseits die SGK, stimulieren bekanntermaßen eine große Anzahl von Transportsystemen inklusive einer Gruppe von Aminosäuretransportern (Ishiki M, 2005; Lang F, 2006; Pedersen SF, 2006; Plas DR, 2005).

Die vorliegenden Beobachtungen legen nahe, dass eine Inhibition der GSK3 β durch PKB/Akt und die SGK-Isoformen den Aminosäuretransport über SN1 inhibieren könnten. Im Gegensatz dazu steht der bereits bekannte stimulierende Effekt der PKB/SGK auf den Aminosäuretransport (Lang F, 2006). Zudem führt ein Mangel an Phosphoinositid-abhängiger Kinase PDK1, einem Stimulator der PKB/SGK, zu einer Beeinträchtigung des intestinalen und renalen Aminosäuretransportes (Rexhepaj R, 2006). Folglich erhöht die Stimulation des Phosphoinositid- (PI-) 3-Kinase-Signalweges eher den Aminosäuretransport, als ihn zu reduzieren. Dieser Effekt kann nicht durch eine Inhibition der GSK3 β erklärt werden kann. Der stimulierende Effekt der SGK1 und der PKB/Akt auf den Aminosäuretransport muss also über andere Mechanismen als über die GSK3 β erfolgen.

Es sind bereits diverse Mechanismen bekannt, welche einen stimulierenden Effekt über PKB und SGK auf den Nährstofftransport ausüben. Dazu gehört die Phosphorylierung der Ubiquitin-Ligase Nedd4-2, die wiederum Zielproteine ubiquitiniert, welche daraufhin abgebaut werden (Lang F, 2006). Es wird vermutet, dass die Inhibition von Nedd4-2 durch die SGK/PKB einen hochregulierenden Einfluss auf den Nährstofftransport hat. Darüber hinaus stimulieren die PKB und die SGK den Nährstofftransport über die Kinase PIKfyve, welche die Insertion von Transporterproteinen in die Plasmamembran fördert (Ikononov OC, 2007; Strutz-Seebohm N (2), 2007; Rutherford AC, 2006; Watson RT 2006). Der Einfluss der PKB/SGK abhängigen Nedd4-2 Inhibierung und die PKB/SGK abhängige PIKfyve-Aktivierung für die Nährstofftransportsysteme schließen offensichtlich den Einfluss der GSK3 β -Inhibierung aus.

Der erhöhte Aminosäuretransport über Zellmembranen der Enterozyten von Mäusen, die die PKB/SGK-resistente Glykogensynthasekinase exprimierten, kann durch eine erhöhte GSK3-Aktivität aufgrund fehlender Hemmung durch die PKB/SGK erklärt werden. Eine PKB/SGK-Resistenz der GSK3 in GSK3^{KI}-Mäusen erhöhte also den Aminosäuretransport im Vergleich zu Wildtypieren.

Abschließend kann die folgende Aussage getroffen werden: Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die GSK3 β zumindest im Xenopus-Expressionssystem den Aminosäuretransport über SN1 erhöht. Passend hierzu war der intestinale Aminosäuretransport in GSK3^{KI}-Mäusen verstärkt. Inwieweit weitere Nährstofftransportsysteme durch die GSK3 β beeinflusst werden, sollte durch weitergehende Untersuchungen geklärt werden.

5. Zusammenfassung



Das Protein β -Catenin ist an der Bildung von Zell-Zell-Kontakten, den sogenannten Adherens-Junctions, beteiligt und fungiert als wichtiges Schlüsselprotein im Wnt-Signalweg. Durch den Wnt-Signalweg werden viele grundlegende zelluläre Prozesse, wie z.B. die Balance zwischen Proliferation und Differenzierung oder Überleben versus Apoptose, gesteuert. In der Pathogenese der polyzystischen Nierenerkrankung spielt ein Defekt im Wnt-Signalweg mit einer exzessiven Anreicherung von β -Catenin eine Rolle.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von β -Catenin auf den transmembranösen Transport durch die Na^+/K^+ -ATPase und den Na^+ -gekoppelten Glukosetransporter SGLT1 untersucht. Es wurde hierfür das bereits seit langem etablierte Expressionssystem der *Xenopus laevis*-Oozyten in Kombination mit der TEVC-Methode und der Chemilumineszenz-basierten Bestimmung der Membranexpression angewendet.

Zur Messung des transmembranösen Stromes über die Na^+/K^+ -ATPase wurde die endogene Na^+/K^+ -ATPase der *Xenopus laevis*-Oozyten verwendet. Hierbei wurden die K^+ -induzierten Ströme gemessen. Zu diesem Zweck wurden die *Xenopus laevis*-Oozyten 4 Stunden lang in K^+ -freier Lösung (ND96 – K^+) präinkubiert und der induzierte K^+ -Strom nach K^+ -Zugabe zum Oozytenbad gemessen. Endogene Kaliumkanäle wurden zuvor mit dem K^+ -Kanalblocker BaCl_2 (5 mM) inhibiert.

Als Ergebnis dieser Arbeit zeigte sich, dass nach Injektion von cRNA von β -Catenin in die Oozyten der K^+ -Pumpenstrom der endogenen Na^+/K^+ -ATPase und der durch den Na^+/K^+ -ATPase-Hemmer Ouabain-gehemmte Strom signifikant höher waren als über die Zellmembran von Oozyten, welche anstelle cRNA von β -Catenin DEPC-Wasser in gleicher Menge injiziert bekamen.

Eine transkriptionelle Wirkung von β -Catenin auf die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase konnte durch weitere Versuche mit dem transkriptionshemmenden Peptidantibiotikums Actinomycin ausgeschlossen werden.

Es kann somit die Aussage getroffen werden, dass der Effekt der Regulation der Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase durch β -Catenin über posttranskriptionelle Mechanismen und nicht über transkriptionelle Hochregulation beispielsweise der SGK1 erfolgt.

Auch in Oozyten, die mit cRNA des Na⁺-Glukose-Cotransporters SGLT1 injiziert wurden, zeigte die zusätzliche Injektion von cRNA des Proteins β -Catenin einen stimulierenden Effekt. Weitere Untersuchungen ergaben, dass β -Catenin die Membranexpression von SGLT1 verstärkt.

Möglicherweise könnte β -Catenin jedoch auch über eine Hochregulation bestimmter Kinasen wie der SGK1 oder über die Hochregulation der Na⁺/K⁺-ATPase Einfluss auf den Na⁺-gekoppelten Glukosetransport haben.

Da β -Catenin jedoch auch nach Inkubation der Oozyten mit dem Transkriptionshemmer Actinomycin eine Hochregulation der Aktivität der SGLT1 verursachte, kann auch hier festgestellt werden, dass posttranskriptionelle Vorgänge beteiligt sein müssen und nicht ausschließlich eine transkriptionelle Wirkung. Allerdings könnte die stimulierende Wirkung von β -Catenin auf die SGLT1-Aktivität zumindest teilweise auf der Erhöhung der Triebkraft durch Aktivitätssteigerung der Na⁺/K⁺-ATPase beruhen.

Die Ergebnisse vorliegender Arbeit zeigen nun eine komplett neue Funktion von β -Catenin für die Regulation des transmembranösen Transports.

Somit kann zusammengefasst werden, dass β -Catenin die Na⁺/K⁺-ATPase und den elektrogenen Glukosetransport über den Na⁺-abhängigen Glukosetransporter SGLT1 stimuliert. Dieser Effekt entsteht vermutlich über eine direkte Interaktion mit den Zellmembranproteinen und ist unabhängig von der genomischen Hochregulation anderer Gene wie der SGK1.

Für die Untersuchung der Regulation des Aminosäuretransportes über SN1 durch die GSK3 β konnte mit Hilfe der TEVC-Methode ermittelt werden, dass bei Koexpression von SN1 und der GSK3 β eine signifikante Erhöhung des transmembranösen, glutamininduzierten Stromes über die Oozytenmembran, im Vergleich zu Oozyten, welche nur SN1 exprimierten, besteht. Eine Expression der GSK3 β ohne SN1 zeigte keine Erhöhung des transmembranösen Stromes. Dadurch konnte bestätigt werden, dass die Erhöhung des transmembranösen Stromes über SN1 und nicht über andere Mechanismen erfolgt.

Zudem wurden jejunale Gewebe von genveränderten GSK3^{Kl}-Mäusen, deren GSK3-Aktivität eine Resistenz gegenüber der PKB/SGK-vermittelten Hemmung

aufwiesen, in Ussingkammerexperimenten mit jejunalem Gewebe von Wildtyp-Tieren verglichen. Dabei wurde ein gesteigerter intestinaler Aminosäuretransport in GSK3^{Kl}-Mäusen entdeckt. Die Ergebnisse vom Xenopus-Expressionssystem und die Resultate der Messungen mit der Ussingkammer legen nahe, dass die Glykogensynthasekinase 3 (GSK3) Einfluss auf den natriumabhängigen Aminosäuretransport nimmt. Der genaue Mechanismus muss in weiteren Untersuchungen ermittelt werden.

Zusammengefasst wurden mit dieser Doktorarbeit neue Funktionen der Proteine β -Catenin und GSK3 identifiziert. Beide Proteine regulieren den elektrogenen Membrantransport.



6 .Literaturverzeichnis



Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W: Functional interaction of beta-Catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 1996; 382: 638-642.

Benzing T, Simons M, Walz G: Wnt signaling in polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2007;18:1389-1398.

Bezanilla F, Vergara J, Taylor RE: Voltage clamping of excitable membranes, in *Methods of Experimental Physics*, edited by Ehrenstein G, Lecar H. New York, Academic Press 1982; 20: 445-511

Boehmer C, Laufer J, Jeyaraj S, Klaus F, Lindner R, Lang F, Palmada M: Modulation of the voltage-gated potassium channel Kv1.5 by the SGK1 protein kinase involves inhibition of channel ubiquitination. *Cell. Physiol. Biochem.* 2008; 22: 591-600.

Bode BP: Recent molecular advances in mammalian glutamine transport. *J. Nutr.* 2001; 131: 2475S-2485S .

Boini KM, Amann K, Kempe D, Alessi DR, Lang F: Proteinuria in mice expressing PKB/SGK-resistant GSK3. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2009; 296: F153-F159.

Boini KM, Bhandaru M, Mack A, Lang F: Steroid hormone release as well as renal water and electrolyte excretion of mice expressing PKB/SGK-resistant GSK3. *Pflugers Arch.* 2008; 456: 1207-1216.

Bonvini P, An WG, Rosolen A, Nguyen P, Trepel J, Garcia de Herreros A, Dunach M, Neckers LM: Geldanamycin abrogates ErbB2 association with proteasome-resistant β -catenin in melanoma cells, increases β -catenin-E-cadherin association, and decreases β -catenin-sensitive transcription. *Cancer Res.* 2001; 61 (4): 1671-7.

Boulland JL, Osen KK, Levy LM, Danbolt NC, Edwards RH, Storm-Mathisen J, Chaudry FA: Cell-specific expression of the glutamine transporter SN1 suggests differences in dependence on the glutamine cycle. *Europ. J. Neurosc.* 2002; 15: 1615-31

Brembeck FH, Rosario M, Birchmeier W: Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2006; 16: 51-59.

Crane RK, Miller D, Bihler L: The restrictions on possible mechanisms of intestinal active transport of sugars in *Membrane Transport and Metabolism*. Czechoslovakian Academy of Sciences 1961.

Chaudhry FA, Reimer RJ, Krizaj D, Barber D, Storm-Mathisen J, Copenhagen DR, Edwards RH: Molecular analysis of system N suggests novel physiological roles in nitrogen metabolism and synaptic transmission. *Cell* 1999; 99: 769-780.

Christensen HN: Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol. Rev.* 1990; 70: 43-77

Clausen T: The Na⁺, K⁺ pump in skeletal muscle: quantification, regulation and functional significance. *Acta Physiol. Scand.* 1996; 156 (3): 227-235.

Crambert G, Hasler U, Beggah AT, Yu C, Modyanov NN, Horisberger JD et al.: Transport and pharmacological properties of nine different human Na, K-ATPase isozymes. *J. Biol. Chem.* 2000; 275(3): 1976-1986.

Cohen P, Frame S: The renaissance of GSK3. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001; 2: 769-776.

Cole AR, Sutherland C: Measuring GSK3 expression and activity in cells. *Methods Mol. Biol.* 2008; 468: 45-65.

Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A: The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J. Clin. Invest.* 2002; 109: 987-991.

Cross HR, Radda GK, Clarke K: The role of Na⁺/K⁺ ATPase activity during low flow ischemia in preventing myocardial injury: a ³¹P, ²³Na and ⁸⁷Rb NMR spectroscopic study. *Magn. Reson. Med.* 1995; 34: 673-685.

Dai F, Yu L, He H, Zhao Y, Yang J, Zhang X, Zhao, S: Cloning and mapping of a novel human serum / glucocorticoid regulated kinase-like gene, SGKL, to chromosome 8q12.3 - q13.1. *Genomics* 1999; 62 (1) : 95-7

Dean RB: Theories of electrolyte equilibrium in muscle. *Biol. Symp.* 3 (1941) 331-348

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

Dehner M, Hadjihannas M, Weiske J, Huber O, Behrens J: Wnt signaling inhibits forkhead box O3a-induced transcription and apoptosis through upregulation of serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1. *J. Biol. Chem.* 2008; 283: 19201-19210.

Dieter M, Palmada M, Rajamanickam J, Aydin A, Busjahn A, Boehmer C, Luft FC, Lang F: Regulation of glucose transporter SGLT1 by ubiquitin ligase Nedd4-2 and kinases SGK1, SGK3, and PKB. *Obes. Res.* 2004; 12: 862-870.

Dumont JN: Oogenesis in *Xenopus Laevis* (Daudin). I. Stages of Oocyte development in Laboratory maintained animals. *J. Morphol.* 1972; 136: 153-179.

Fei YJ, Sugawara M, Nakanishi T, Huang W, Wang H, Prasad PD, Leibach FH, Ganapathy V: Primary structure, genomic organization, and functional and electrogenic characteristics of human system N 1, a Na⁺- and H⁺-coupled glutamine transporter. *J. Biol. Chem.* 2000; 275(31): 23707-17

Fejes-Toth G, Frindt G, Naray-Fejes-Toth A, Palmer LG: Epithelial Na⁺ channel activation and processing in mice lacking SGK1. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2008; 294: F1298-F1305.

Finkel AS, Gage PW: Conventional voltage clamping with two intracellular microelectrodes: in *Voltage and patch clamping with microelectrodes*, edited by Smith TG Jr, Lecar H, Redman SJ, Gage PW, Bethesda MA. American Physiological Society 1985; 47-94.

Geering K, Theulaz I, Verrey F, Hauptle MT, Rossier BC: A role for the beta-subunit in the expression of functional Na⁺-K⁺-ATPase in *Xenopus* oocytes. *Am. J. Physiol.* 1989; 257(5 Pt 1): C851-C858.

Gehring EM, Zurn A, Klaus F, Laufer J, Sopjani M, Lindner R, Strutz-Seebohm N, Tavare JM, Boehmer C, Palmada M, Lang UE, Seebohm G, Lang F: Regulation of the glutamate transporter EAAT2 by PIKfyve. *Cell Physiol. Biochem.* 2009; 24: 361-368.

Gill JE, Jotz MM, Young SG, Modest EJ, Sengupta SK: 7-Aminoactinomycin D as a cytochemical probe. I. Spectral proper. *J. Histochem. Cytochem.* 1975; 23: 793

Gloor SM: Relevance of Na⁺/K⁺-ATPase to local extracellular potassium homeostasis and modulation of synaptic transmission. *FEBS Lett.* 1997; 412(1):1-4

Glynn IM: The electrogenic sodium pump. In: *Electrogenic Transport: Fundamental Principles and Physiological Implications*. M. P. Blaustein, M. Lieberman. eds, Raven Press, NY. 1984: 33-48

Grahammer F, Henke G, Sandu C, Rexhepaj R, Hussain A, Friedrich B, Risler T, Metzger M, Just L, Skutella T, Wulff P, Kuhl D, Lang F: Intestinal function of gene-targeted mice lacking serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* 2006; 290: G1114-G1123.

Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR, Marbaix G: Use of Frog Eggs and Oocytes for The study of Messenger RNA and its Translation in Living Cells. *Nature* 1971; 233: 177-182.

Halliwel JV, Plant TD, Standen NB: *Voltage Clamp Techniques, in Microelectrode techniques*, edited by Standen NB, Gray PTA, Whitaker MJ. Cambridge, England. The company of biologists 1987; 13-28.

Hatzis P, van der Flier LG, van Driel MA, Guryev V, Nielsen F, Denissov S, Nijman IJ, Koster J, Santo EE, Welboren W, et al.: Genome-wide pattern of TCF7L2/TCF4 chromatin occupancy in colorectal cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* 2008; 28: 2732-2744.

Harris TJ, Peifer, M.: Decisions, decisions: beta-catenin chooses between adhesion and transcription. *Trends Cell Biol.* 2005; 15: 234-237.

Harris PC, Torres VE: Polycystic Kidney Disease. *Annu. Rev. Med.* 2008 ;60: 321-337.

He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW: Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998; 281: 1509-1512.

Hirsch JR, Loo DD, Wright EM: Regulation of Na⁺/glucose cotransporter expression by protein kinases in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biol. Chem.* 1996: 271: 14740-14746.

Hoppler S, Kavanagh CL: Wnt signalling: variety at the core. *J. Cell Sci.* 2007; 120: 385-393.

Horisberger JD, Jaunin P, Good PJ, Rossier BC, Geering K: Coexpression of alpha 1 with putative beta 3 subunits results in functional Na⁺/K⁺ pumps in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88(19): 8397-8400.

Hofbauer A: Immunhistochemie

<http://www.biologie.uni-Regensburg.de/Zoologie/Schneuwly/Hofbauer/DROSI/strentw42.htm>, (Abgerufen am 17.06.2013)

Ikonomov OC, Sbrissa D, Dondapati R, Shisheva A: ArPIKfyve-PIKfyve interaction and role in insulin-regulated GLUT4 translocation and glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Exp. Cell. Res.*, 2007 Jul 1; 313(11): 2404-16

Ishiki M, Klip A: Minireview: recent developments in the regulation of glucose transporter-4 traffic: new signals, locations, and partners. *Endocrinology* 2005; 146: 5071-5078.

Jaunin P, Horisberger JD, Richter K, Good PJ, Rossier BC, Geering K: Processing, intracellular transport, and functional expression of endogenous and exogenous alpha-beta 3 Na,K-ATPase complexes in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 1992; 267(1): 577-585.

Jin T, George FI, Sun J: Wnt and beyond Wnt: multiple mechanisms control the transcriptional property of beta-catenin. *Cell Signal* 2008; 20: 1697-1704.

Kilberg MS, Handlogten ME, Christensen HN: Characteristics of an amino acid transport system in rat liver for glutamine, asparagine, histidine, and closely related analogs. *J. Biol. Chem.* 1980; 255, 4011-4019

Kusano K, Miledi R, Stinnakre J: Acetylcholine receptors in the Oocyte Membrane. *Nature* 1977; 270: 739 - 741.

Kusano K, Miledi R, Stinnakre J: Cholinergic and catecholaminergic receptors in the *Xenopus* Oocyte membrane. *J. Physiol.* 1982; 328, 143 - 170.

Lang F, Bohmer C, Palmada M, Seebohm G, Strutz-Seebohm N, Vallon V: (Patho)physiological significance of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoforms. *Physiol. Rev.* 2006; 86: 1151-1178.

Läuger P: *Electrogenic Ion Pumps*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, USA 1991.

Logan CY, Nusse R: The Wnt Signaling Pathway in Development and Disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2004; 20: 781-810.

Masui Y: Relative roles of the pituitary, follicle cells and progesterone in the induction of oocyte maturation in *Rana pipiens*. *J. Exp. Zool.* 1967; 365 ff.

McManus EJ, Sakamoto K, Armit LJ, Ronaldson L, Shpiro N, Marquez R, Alessi DR: Role that phosphorylation of GSK3 plays in insulin and Wnt signalling defined by knockin analysis. *EMBO. J.* 2005; 24: 1571-1583.

Molenaar M, van de Wetering M, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, Korinek V, Roose J, Destree O, and Clevers H: XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 1996; 86, 391-399.

Mora A, Sakamoto K, McManus EJ, Alessi DR: Role of the PDK1-PKB-GSK3 pathway in regulating glycogen synthase and glucose uptake in the heart. *FEBS Lett.* 2005; 579: 3632-3638.

Naishiro Y, Yamada T, Idogawa M, Honda K, Takada M, Kondo T, Imai K, Hirohashi S: Morphological and transcriptional responses of untransformed intestinal epithelial cells to an oncogenic beta-catenin protein. *Oncogene* 2005; 24: 3141-3153.

Newsholme P, Lima MMR, Procopio J, Pithon-Curi TC, Doi SQ, Bazotte RB: Glutamine and Glutamate as vital metabolites. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2003; 36(2): 153-163

Nusse R, Varmus HE: Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 1982; 31, 99-109.

O'Connor CM, Smith DL: Inhibition of oocyte maturation by theophylline: Possible mechanism of action. *Developmental Biology* 1976; 52 (2): 318-322

, Brosnan JT, Brosnan M.E: Hepatic zonation of the catabolism of arginine and ornithine in the perfused rat liver. *Biochem. J.* 1998; 330, 627-632.

Overton E: Beiträge zur allgemeinen Muskel- und Nervenphysiologie. II. Mitteilung über die Unentbehrlichkeit von Natrium- (oder Lithium-) Ionen für den Kontraktionsakt des Muskels. *Pflügers Arch. Ges. Physiol.* 1992; (1902): 346-386.

Peruzzi B, Bottaro DP: Beta-catenin signaling: linking renal cell carcinoma and polycystic kidney disease. *Cell Cycle* 2006; 5: 2839-2841.

Pedersen SF: The Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 in stress-induced signal transduction: implications for cell proliferation and cell death. *Pflugers Arch.* 2006; 452: 249-259.

Plas DR, Thompson CB: Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving. *Oncogene* 2005; 24: 7435-7442.

Rexhepaj R, Grahammer F, Volkl H, Remy C, Wagner CA, Sandulache D, Artunc F, Henke G, Nammi S, Capasso G, Alessi DR, Lang F: Reduced intestinal and renal amino acid transport in PDK1 hypomorphic mice. *FASEB J.* 2006; 20: 2214-2222.

Rutherford AC, Traer C, Wassmer T, Pattini K, Bijny MV, Carlton JG, Stenmark H, Cullen PJ: The mammalian phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase (PIKfyve) regulates endosome-to-TGN retrograde transport. *J. Cell Sci.* 2006 Oct1M 119 (Pt19): 39444-57

Sakoda H, Gotoh Y, Katagiri H, Kurokawa M, Ono H, Onishi Y, Anai M, Ogihara T, Fujishiro M, Fukushima Y, Abe M, Shojima N, Kikuchi M, Oka Y, Hirai H, Asano T: Differing roles of Akt and serum- and glucocorticoid-regulated kinase in glucose metabolism, DNA synthesis, and oncogenic activity. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 25802-25807.

Sato JD, Chapline MC, Thibodeau R, Frizzell RA, Stanton BA: Regulation of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) by serum- and glucocorticoid-inducible kinase (SGK1). *Cell Physiol. Biochem.* 2007; 20: 91-98.

Schmidt RF, Thews G, Lang F: *Physiologie des Menschen.* 28 ed. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 2000.

Setiawan I, Henke G, Feng Y, Bohmer C, Vasilets LA, Schwarz W, Lang F: Stimulation of *Xenopus* oocyte Na⁽⁺⁾,K⁽⁺⁾ATPase by the serum and glucocorticoid-dependent kinase sgk1. *Pflugers Arch.* 2002; 444: 426-431.

Shaw JR, Sato JD, VanderHeide J, LaCasse T, Stanton CR, Lankowski A, Stanton SE, Chapline C, Coutermarsh B, Barnaby R, Karlson K, Stanton BA: The role of SGK and CFTR in acute adaptation to seawater in *Fundulus heteroclitus*. *Cell Physiol. Biochem.* 2008; 22: 69-78.

Shaw M, Cohen P, Alessi DR: Further evidence that the inhibition of glycogen synthase kinase-3 β by IGF-1 is mediated by PDK1/PKB-induced phosphorylation of Ser-9 and not by dephosphorylation of Tyr-216. *FEBS. Lett.* 1997; 416: 307-311.

Simons M, Walz G: Polycystic kidney disease: cell division without a clue? *Kidney Int.* 2006; 70: 854-864.

Skou JC: The identification of the sodium-pump as the membrane-bound Na⁺/K⁺-ATPase: a commentary by Jens Chr. Skou on 'The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves'. *Biochem. Biophys. Acta* 23 1957; 394-401.

Sopjani M, Bhavsar SK, Fraser S, Kemp BE, Föller M, Lang F.: Regulation of Na⁺-coupled glucose carrier SGLT1 by AMP-activated protein kinase. *Mol. Membr. Biol.* 2010 Apr; 27(2-3): 137-44.

Strutz-Seebohm N (1), Gutcher I, Decher N, Steinmeyer K, Lang F, Seebohm G: Comparison of potent Kv1.5 potassium channel inhibitors reveals the molecular basis for blocking kinetics and binding mode. *Cell Physiol. Biochem.* 2007a; 20: 791-800.

Strutz-Seebohm N (2), Shojaiefard M, Christie D, Tavare J, Seebohm G, Lang F: PIKfyve in the SGK1 mediated regulation of the creatine transporter SLC6A8. *Cell Physiol. Biochem.* 2007b; 20: 729-734.

Subramanian S, Glitz P, Kipp H, Kinne RK, Castaneda F: Protein kinase-A affects sorting and conformation of the sodium-dependent glucose co-transporter SGLT1. *J. Cell Biochem.* 2009; 106, 444-452.

Therien AG, Nestor NB, Ball WJ, Blostein R. Tissue-specific versus isoform-specific differences in cation activation kinetics of the Na⁺/K⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 1996; 271(12): 7104-7112.

Uldry M, Thorens B: The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflugers Arch.* 2004; 447: 480–9.

Ussing H. Zerhan K: Active Transport of Sodium as the Source of Electric Current in the Short-circuited Isolated Frog Skin. *Acta phys. Scandinav.* vol. 23, 1950, pp. 110-127.

Verrey F, Summa V, Heitzmann D, Mordasini D, Vandewalle A, Feraille E, Zecevic M: Short-term aldosterone action on Na,K-ATPase surface expression: role of aldosterone-induced SGK1? *Ann. N Y. Acad. Sci.* 2003; 986: 554-561.

Waldegger S, Barth P, Raber G, Lang F: Cloning and characterization of a putative human serin / threonine protein kinase transkriptionally modified during anisotonic alternations in cell volume. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997; Vol. 94, pp. 4440 - 4445.

Waldegger S, Barth P, Forrest JR jr, Greger R, Lang F: Cloning of sgk serine-threonine protein kinase from shark rectal gland -a gene induced by hypertonicity and secretagoges. Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol. 1998; 436: 575 - 580

Watson RT, Pessin JE: Bridging the GAP between insulin signaling and GLUT4 translocation. Trends Biochem. Sci. 2006 Arp; 31(4): 215-22

Wright EM, Hirayama B, Hazama A, Loo DD, Suplisson S, Turk E, Hager KM: The Sodium/Glucose Cotransporter (SGLT1). Soc. Gen Physiol. Ser. 1993; 48: 229-41.

Wright EM, Turk E: The sodium glucose cotransport family SLC5. Pflugers Arch. 2004; 447: 510–8.

Wright EM, Loo DDF, Hirayama BA, Turk E: Surprising Versatility of Na⁺/Glucose Cotransporters (SLC5). Physiology 2007; 19: 370–6.

Wulff P, Vallon V, Huang DY, Volkl H, Yu F, Richter K, Jansen M, Schlunz M, Klingel K, Loffing J, Kauselmann G, Bosl MR, Lang F, Kuhl D: Impaired renal Na⁽⁺⁾ retention in the SGK1-knockout mouse. J. Clin. Invest. 2002; 110: 1263-1268.

Wyatt AW, Hussain A, Amann K, Klingel K, Kandolf R, Artunc F, Grahammer F, Huang DY, Vallon V, Kuhl D, Lang F: DOCA-induced phosphorylation of glycogen synthase kinase 3beta. Cell Physiol. Biochem. 2006; 17: 137-144.

Yang F, Li X, Sharma M, Sasaki CY, Longo DL, Lim B, Sun Z: Linking β-Catenin to androgen-signaling pathway. J. Biol. Chem. 2002; 277 (13).

Zecevic M, Heitzmann D, Camargo SM, Verrey F: SGK1 increases Na⁺/K⁺-ATPase cell-surface expression and function in *Xenopus laevis* oocytes. Pflugers Arch. 2004; 448: 29-35.

7. Publikationen



Publikationen:

- Munoz C, Saxena A, Pakladok T, Bogatikov E, **Wilmes J**, Seebohm G, Föllner M, Lang F: **The Stimulation of HERG channel activity by β -catenin**. PLoS One. 2012; 7(8): e43353
- **Wilmes J**, Haddad-Tóvolli R, Alesutan I, Munoz C, Sopjani M, Pelzl L, Bogatikov E, Fedele G, Faggio C, Seebohm G, Föllner M, Lang F: **The Regulation of KCNQ1/KCNE1 by β -Catenin**. Mol. Membr. Biol. 2012 May-Jun; 29(3-4): 87-94
- Sopjani M, Alesutan I, **Wilmes J**, Dërmaku-Sopjani M, Lam RS, Koutsouki E, Jakupi M, Föllner M, Lang F: **The Stimulation of Na⁺/K⁺ ATPase activity and Na⁺-coupled glucose transport by β -catenin**. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010 Nov 19; 402(3): 467-70
- Bhavsar KS, Schmidt S, Bobbala D, Nurbaeva KM, Hosseinzadeh Z, Merches K, Fajol A, **Wilmes J**, Lang F: **AMPK α 1-sensitivity of Orai1 and Ca²⁺ entry in cytotoxic T-Lymphocytes**. Cell Physiol. Biochem. 2013 MS057

Kongressbeiträge:

- Joint Meeting of the Scandinavian and German Physiological Societies in Copenhagen (Postervorstellung):
The Glycogen synthase kinase 3 in the regulation of amino acid transport
Wilmes J, Kempe S, Rexhepaj R, Sopjani M, Föller M, Lang F.

- Forschungskolloquium der Universität Tübingen in Tübingen (Postervorstellung):
The Stimulation of Na⁺/K⁺ ATPase activity and Na⁺ coupled glucose transport by β -catenin.
Wilmes J, Sopjani M, Alesutan I, Dërmaku-Sopjani M, Lam RS, Koutsouki E, Jakupi M, Föller M, Lang F.

8. Erklärung



Sehr geehrte Damen und Herren,

hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

- Sämtliche Arbeiten zum Thema SN1/GSK3 β im Rahmen der TEVC-Technik wurden allein durch mich selbst durchgeführt.
- Arbeiten im Zusammenhang mit der Immunhistochemie wurden von Ioana Alesutan durchgeführt. Die Oozyten, die für diese Arbeit benötigt wurden, wurden durch mich vorbereitet und injiziert.
- Die Ussingkammerexperimente in Kombination mit dem Halten von Mäusen wurden von Rexhep Rexhepaj durchgeführt.
- Die Voltage-Clamp-Messungen von SGLT1, der Na⁺/K⁺-ATPase in der Regulation durch β -Catenin wurden zu 50% von mir selbst durchgeführt. Die restlichen Messungen wurden von Mentor Sopjani vorgenommen.
- Die ansonsten in dieser Arbeit erwähnten Arbeitsschritte, zum Beispiel das Herstellen von Lösungen oder sonstige Tätigkeiten, wurden im Rahmen meiner Messungen von mir selbst durchgeführt.
- Die Operationen wurden durch mich, stets unter Aufsicht von fachkundigem Personal durchgeführt.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Jan Wilmes

Kressberg, den 03. März 2014