

4. Diskussion

4.1	Der Nachweis des Sgk1-Genproduktes	82
4.2	Die subzelluläre Lokalisation von Sgk1	84
4.3	Membranassoziation und Degradation von Sgk1	87
4.4	Funktionelle Konsequenzen der mitochondrialen Lokalisation von Sgk1	88
4.5	Sgk1 hat wahrscheinlich keinen Einfluß auf die Transkription von Genen	90
4.6	Die Sgk1-abhängige Phosphorylierung von NDRG1 im Hippocampus	92
4.7	Potenzielle Funktionen von Sgk1 im Nervensystem	93
4.8	Fazit und Ausblick	95

4.1 Der Nachweis des Sgk1 Genproduktes

Zur Charakterisierung von Sgk1 wurde in dieser Arbeit ein polyklonales Antiserum gegen den C-terminalen Bereich von Sgk1 hergestellt und über Protein A-Sepharose aufgereinigt. Das Antiserum wurde in Western Blot-Analysen von Sgk1-transfizierten HEK293-Zellen mit vier weiteren α Sgk1-Antikörpern sowie einem Antikörper gegen einen am C-Terminus der transfizierten Konstrukte gelegenen Flag-tag verglichen.

Die Analysen zeigten, daß sich Sgk1 in Abwesenheit eines Proteasominhibitors nur in Zellysaten mit einem hohen Sgk1-Expressionsniveau nachweisen lies. Da alle getesteten α Sgk1-Antikörper sowie der α Flag-Antikörper annähernd die gleichen Ergebnisse lieferten, kann davon ausgegangen werden, daß die Schwierigkeiten beim Nachweis von Sgk1 ausschließlich auf die Instabilität des Proteins, und nicht auf die Qualität der Antikörper zurückzuführen sind. Für diese Interpretation spricht auch die Tatsache, daß sich die Signalstärke durch Verwendung eines Proteasominhibitors stark erhöhte und die Variante Sgk1 Δ 1-59-EGFP von allen Antikörpern problemlos detektiert wurde (vergleiche Abbildung 3.2).

Nach den Befunden mit Zellen, die Sgk1 überexprimieren, war zu erwarten, daß der Nachweis des Proteins auch in primärem Gewebe mit Western Blot-Analysen schwierig sein würde. Durch den Vergleich von Gewebe aus Wildtyp- und Sgk1^{-/-} Mäusen zeigte sich, daß sämtliche sichtbaren Banden nicht auf die Detektion von Sgk1 zurückzuführen waren. Die fünf getesteten α Sgk1-Antikörper unterschieden sich lediglich in der Anzahl der unspezifisch erkannten Proteine. Ähnliche Ergebnisse wurden in einer kürzlichen publizierten Studie berichtet, bei der es mit vier anderen α Sgk1-Antikörper in Western Blot-Analysen von Gewebelysaten aus Wildtyp- und Sgk1^{-/-} Mäusen nicht möglich war, Sgk1 zu detektieren (Cordas *et al.*, 2007).

Offensichtlich ist die basal exprimierte Proteinmenge zu gering, um nachgewiesen werden zu können. Tatsächlich wurde in den meisten Arbeiten, die sich mit der Expression von Sgk1 beschäftigen, nur die mRNA-Expression und nicht die Proteinexpression gezeigt. Neben der Instabilität des Proteins könnten auch Sequenzelemente der Sgk1 mRNA für die geringe Kopienzahl des Genproduktes mitverantwortlich sein. Im 3' untranslatierten Bereich finden sich eine sogenannte K-Box und ein sogenanntes GAIT Element, die in der Lage sind, die Translation zu reprimieren (Lai *et al.*, 1998; Sampath *et al.*, 2003).

In dieser Arbeit gelang der Nachweis von Sgk1 in primärem Mausgewebe erst nach vorheriger Stimulation mit Dexamethason – allerdings nur mit einem der Antikörper. Darüberhinaus waren die spezifischen Signale bei sehr viel Hintergrund sehr schwach. Es muß also auch hier davon ausgegangen werden, daß sich die Detektion im Bereich der Nachweisgrenze befand.

Mit Immunfluoreszenzfärbungen von Gehirnschnitten aus Mäusen, bei denen die Sgk1-Expression zuvor durch generalisierte Krampfanfälle im Hippocampus stark hochreguliert wurde, war der Nachweis von Sgk1 ebensowenig möglich wie in Schnitten von Nieren der gleichen Tiere. Auch für diese

Analysen, die in unserem Labor durchgeführt wurden, wurden verschiedene α Sgk1-Antikörper eingesetzt. Zwar lieferten alle Antikörper Signale, die gleichen Signale wurden jedoch auch in Sgk1^{-/-} Mäusen beobachtet.

Die Befunde zum Nachweis des Sgk1 Proteins aus dieser Arbeit stellen die Ergebnisse aller Publikationen in Frage, die auf dem Nachweis von Sgk1 auf Proteinebene in primärem Gewebe, und teilweise auch in Zelllinien beruhen.

So wird in vier Publikationen die räumliche Proteinexpression von Sgk1 mit Hilfe der Immunfluoreszenz in Schnitten von primärem Gewebe untersucht. Zwei der Arbeiten verwenden zum Nachweis von Sgk1 in der Niere und im Darmepithel einen der Antikörper, der auch in dieser Arbeit getestet wurde, und sehr viele unspezifische Signale zeigte (Alvarez de la Rosa *et al.*, 2003; Coric *et al.*, 2004; vergleiche Abbildung 3.3A). Darüberhinaus gelang mit demselben Antikörper in unserer Arbeitsgruppe kein spezifischer Nachweis von Sgk1 in der Immunfluoreszenz von Mäusenieren und -gehirnen. Interessanterweise konnten die Autoren in beiden Publikationen keine relevanten Veränderungen der Sgk1-Expression nach Stimulation mit Kortikoiden beobachten. Das Sgk1 Expressionmuster in der Niere unterscheidet sich außerdem von dem, das Loffing und Koautoren unter Verwendung eines anderen Antikörpers beobachtet haben (Loffing *et al.*, 2001). In einer anderen Arbeit wird die hippocampale Lokalisation von Sgk1 durch Immunfluoreszenz untersucht (Wärntges *et al.*, 2002). Da in der Arbeit keinerlei Kontrollen durchgeführt wurden, läßt sich die Qualität der Resultate nur schwer abschätzen. Die Wahrscheinlichkeit, daß bei der geringen basalen Expression von Sgk1 in der gezeigten CA3 Region (vergleiche Abbildung 1.7) tatsächlich das Protein nachgewiesen wurde, ist jedoch als gering einzuschätzen.

In einigen Publikationen werden Western Blot-Analysen zum Nachweis von Sgk1 in Zelllinien oder primärem Gewebe mit einer ungewöhnlichen hohen Sgk1-Expression gezeigt. Obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, daß in einzelnen Zelllinien der Abbau von Sgk1 verlangsamt ist, ist eher fraglich, ob es sich bei den gezeigten Banden tatsächlich um Sgk1 handelt. Bei solchen Immunoblots aus primärem Gewebe muß davon ausgegangen werden, daß es sich bei den Signalen nicht um Sgk1 handelt. Dies ist z.B. bei zwei Publikationen zur Rolle von Sgk1 bei Lernprozessen im Hippocampus der Ratte der Fall (Eminy *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2006). Die Ergebnisse beider Arbeiten basieren zu einem großen Teil auf der Analyse der Sgk1-Expression durch Western Blot-Analysen und müssen in ihrer Gesamtheit in Frage gestellt werden. Das gleiche gilt für eine Publikation, die Sgk1 in Zusammenhang mit der Stressantwort von Cardiomyocyten bringt (Aoyama *et al.*, 2005).

Insgesamt sollten alle Daten, die eine Proteinexpression von Sgk1 zeigen, sehr kritisch betrachtet werden. Um sicherzustellen, daß die erhaltenen Signale nicht unspezifisch sind, ist es unbedingt notwendig, Wildtyp-Gewebe mit Sgk1^{-/-} Gewebe zu vergleichen. Bei Zelllinien besteht eine Möglichkeit zum Nachweis der Spezifität in der Verwendung von siRNAs zur Inhibition der Proteinexpression.

4.2 Die Subzelluläre Lokalisation von Sgk1

Die subzelluläre Lokalisation hat einen wesentlichen Einfluß auf Funktion eines Proteins. Umso erstaunlicher war es, daß die über Sgk1 bereits publizierten Daten zu dieser Fragestellung relativ divers und teilweise widersprüchlich waren. Ein zentraler Aspekt dieser Arbeit war daher die systematische Analyse der subzellulären Lokalisation und Zielsteuerung von Sgk1.

Da es nicht möglich war, Sgk1 direkt mit Hilfe von Antikörpern in Immunfluoreszenzuntersuchungen von Zellen oder primärem Gewebe nachzuweisen, wurde Sgk1 mit EGFP fusioniert und die subzelluläre Lokalisation mit Hilfe der konfokalen Laser Scanning-Mikroskopie analysiert. Um Aussagen über die subzelluläre Lokalisation von Sgk1 *in vivo* treffen zu können, wurde murines Lebergewebe subzellulär fraktioniert und die einzelnen Fraktionen mit Western Blot-Analysen auf ihren Sgk1-Gehalt hin untersucht. Beide Ansätze zeigten, daß Sgk1 hauptsächlich mitochondrial lokalisiert ist. Die Fraktionierungsexperimente sind dabei eher zur Bestätigung der mitochondrialen Lokalisation aufzufassen und nicht zum Ausschluß weiterer Lokalisationen, da sich (1) selbst nach dem Konzentrationseffekt durch die Fraktionierung die Sgk1-Proteinmengen im Bereich der Nachweisgrenze befinden, und (2) zuvor eine Dexamethason-Behandlung der Tiere notwendig war, um das Protein überhaupt detektieren zu können. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß Dexamethason einen Einfluß auf die Lokalisation von Sgk1 hat (Buse *et al.*, 1999).

Die mitochondriale Lokalisation konnte desweiteren mit einem dritten Ansatz, einem *in vitro*-Import Assay in aufgereinigte Mitochondrien, bestätigt werden.

Während diese Arbeit entstand, wurde erstmals auch von zwei weiteren Arbeitsgruppen über eine mitochondriale Sgk1-Lokalisation berichtet (Cordas *et al.*, 2007; Belova *et al.*, 2006). Die Publikationen erschienen, nachdem die Ergebnisse dieser Arbeit bereits veröffentlicht waren.

Sowohl in primärem Lebergewebe, als auch bei der Mikroskopie transfizierter HEK293 Zellen konnte Sgk1 im Cytosol nachgewiesen werden. In Kapitel 3.6 dieser Arbeit wurde dargestellt, daß die Translation von Sgk1 alternativ an M60 beginnen kann. Die cytoplasmatische Lokalisation beruht daher möglicherweise auf der Benutzung des alternativen Translationstarts, aus dem eine funktionsfähige Sgk1 ohne mitochondriales Zielsteuerungssignal resultiert. In der Umgebung des alternativen Translationstarts befindet sich eine Kozak-Sequenz. Es bleibt aber unklar, ob der Translationstart bei M60 ein Überexpression-Artefakt ist, oder auch *in vivo* eine Rolle spielt. Während bei der Mikroskopie nicht zwischen beiden Varianten unterschieden werden kann, läßt sich die bei M60 beginnende Variante in Western Blot-Analysen durch ihr schnelleres Laufverhalten identifizieren. In keinem der Immunoblots aus primärem Gewebe konnte eine bei etwa 40 kD laufende Form von Sgk1 nachgewiesen werden, auch nicht in der cytosolischen Fraktion der Mauslebern. Dennoch kann die Existenz einer solchen Variante nicht ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse zur mitochondrialen Lokalisation von Sgk1 stehen im Widerspruch zu den meisten bisher publizierten Daten, die über eine nukleäre, Plasmamembran-, oder ER-Lokalisation berichten (siehe Kapitel 1.5).

Mit den hier verwendeten Methoden konnte Sgk1 in keinem Fall an der Plasmamembran nachgewiesen werden. Bei genauer Betrachtung zeigt sich, daß eine Lokalisation von Sgk1 an der Plasmamembran nie eindeutig gezeigt wurde. Die Tatsache, daß Sgk1 mit der Plasmamembran assoziiert ist, basiert zunächst auf der Annahme einer Interaktion von Sgk1 mit Plasmamembran-Proteinen wie Nedd4-2 oder verschiedenen Transportern (siehe Kapitel 1.6-1.9). In zwei Arbeiten wird aus den gezeigten Daten eine Plasmamembran-Lokalisation von Sgk1 abgeleitet (Brickley *et al.*, 2002; Alvarez de la Rosa *et al.*, 2003). Mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Untersuchungen werden Färbungen aus einer transfizierten Zelllinie bzw. primärem Nierengewebe gezeigt. In beiden Fällen wird eine vermeidliche Kolo-kalisation mit einem Plasmamembranprotein als Beweis für die Membranlokalisation von Sgk1 verwendet. Die Ergebnisse sind (1) durch die Schwierigkeiten beim Nachweis von Sgk1 mit Antikörpern zweifelhaft (vergleiche Kapitel 4.1), und (2) sind Qualität und Vergrößerung der gezeigten Aufnahmen völlig unzureichend, um eine solche Aussage zu treffen. In einem zweiten experimentellen Ansatz wurden in beiden Publikationen Zellen aufgeschlossen und durch Zentrifugation in ein 100.000g-Pellet, bzw. ein 250.000g-Pellet und einen löslichen Überstand separiert. Das Vorhandensein von Sgk1 in den Pellets wurde als Beweis für seine membranständigkeit angeführt, da sich im Pellet auch Plasmamembranproteine nachweisen ließen. Dieser Beweis ist unzulässig, da sich ohne vorherige Abtrennung in den Pellets auch Bestandteile anderer Organellen, wie z.B. Mitochondrien befinden. Weitere Organellenmarker, mit deren Hilfe eine solche Kontamination der vermeidlichen Membranfraktion hätte nachgewiesen werden können, wurden in den beiden oben genannten Arbeiten nicht verwendet.

Sgk1 besitzt an seinem C-Terminus eine potenzielle PDZ-Bindedomäne, über die eine Interaktion mit Proteinen an der Plasmamembran denkbar wäre (Sheng & Sala, 2001). Bei den in dieser Arbeit verwendeten C-terminalen EGFP-Fusionsproteinen würde die PDZ-Bindedomäne maskiert werden und eine Lokalisation, die von einer PDZ-Interaktion abhängt, wäre nicht mehr nachweisbar. In zwei Publikationen, bei denen der N-Terminus von Sgk1 mit EGFP fusioniert wurde, wird gezeigt, daß auch der C-Terminus der Kinase nicht für eine Assoziation mit der Plasmamembran verantwortlich ist (Shelly & Herrera, 2002; Naray-Feyes-Tóth *et al.*, 2004).

In mehreren Arbeiten wurde, in Analogie zu PKB/Akt, eine Stimulus- oder Zellzyklus-abhängige Translokation von Sgk1 in den Zellkern beschrieben. Eine solche Lokalisation konnte in dieser Arbeit weder nach subzellulärer Fraktionierung von Mäuselebern, noch durch Mikroskopie von Sgk1-EGFP bestätigt werden. In keinem Fall ließ sich mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie von HEK293-Zellen eine Anreicherung von Sgk1 im Zellkern nachweisen, auch nicht nach einer Hitzeschock- oder Serumbehandlung, zwei Stimuli, die zu einer nukleären Translokation von Sgk1 führen sollen (Leong *et al.*, 2003).

Nicht nur in dieser Arbeit, sondern auch in zahlreichen anderen Publikationen konnte keine nukleäre Lokalisation von Sgk1 nachgewiesen werden (Alvarez de la Rosa *et al.*, 1999; Brickley *et al.*, 2002; Coric *et al.*, 2004; Bogusz *et al.*, 2006; Cordas *et al.*, 2007). Das putative Kernlokalisationssignal befindet sich im Bereich der Kinasedomäne von Sgk1 (Maiyar *et al.*, 2003; siehe auch Kapitel 1.5) und es ist grundsätzlich denkbar, daß dieses Signal mit der N-terminalen Mitochondrien-

Zielsteuerungssequenz konkurriert. In einem solchen Fall müßte sich Sgk1 im Zellkern nachweisen lassen, wenn der N-Terminus entfernt wird. Dies war jedoch weder in dieser Arbeit, noch bei Cordas und Koautoren (2007) der Fall. Wie lassen sich dann die Ergebnisse zur stimulusabhängige Translokation von Sgk1 aus dem Cytosol in den Zellkern aus den Arbeitsgruppen von Gary Firestone und Joanne Richards erklären? Die Aussagen zur nukleären Lokalisation von Sgk1 beruhen im wesentlichen auf Antikörperfärbungen und Immunfluoreszenzmikroskopie (Gonzalez-Robayna *et al.*, 2005; Maiyar *et al.*, 2003; Leong *et al.*, 2002; Buse *et al.*, 1999), sowie Immunhistochemie von ovariellm Primär-gewebe (Alliston *et al.*, 2005). Es ist daher auch hier gut möglich, daß die eingesetzten Antikörper nicht endogene Sgk1, sondern z.B. eine verwandte Kinase wie PKB/Akt, Sgk2 oder Sgk3 erkannt haben. Darüberhinaus fehlen in einigen Fällen entsprechende Kontrollen und die gezeigten Immunfluoreszenzbilder sind teilweise von sehr schlechter Qualität.

Fraglich sind auch die Ergebnisse des *yeast two-hybrid screens*, mit dessen Hilfe der Zellkernimport-Faktor Importin- α als Interaktionspartner von Sgk1 identifiziert wurde (Maiyar *et al.*, 2003), da sich sowohl in unseren Labor, als auch in anderen Instituten gezeigt hat, daß sich *yeast two-hybrid* Experimente mit Sgk1 nicht durchführen lassen (Xiaosong Mao, 2004; Florian Lang, persönliche Mitteilung).

Obwohl sie für bestimmte Gewebe nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann, spricht die aktuelle Datenlage gegen eine nukleäre Lokalisation von Sgk1 und damit auch gegen eine dynamische Regulation der subzellulären Lokalisation, wie sie in einigen Arbeiten postuliert wurde (Leong *et al.*, 2002; Buse *et al.*, 1999; Alliston *et al.*, 2005)

Während diese Arbeit entstand, wurde in zwei Publikationen eine Lokalisation von Sgk1 am ER postuliert. Beide Arbeiten stützen sich dabei auf konfokale Fluoreszenzmikroskopie und die Kolokalisation mit einem ER-Marker. Bogusz und Koautoren verwenden COS-7 Zellen, die mit Sgk1-EGFP transfiziert wurden (Bogusz *et al.*, 2006), Arteaga *et al.* verwenden Antikörperfärbungen zum Nachweis überexprimierter Sgk1 in COS-7 Zellen und endogener Sgk1 in sogenannten M1 Zellen, deren Herkunft nicht angegeben wird. Auch hier sind die gezeigten mikroskopischen Abbildung technisch mangelhaft, und zeigen in einem Fall eher keine Kolokalisation zwischen Sgk1 und dem ER-Marker Calnexin (Bogusz *et al.*, 2006).

Eine ER-Lokalisation von Sgk1 ist dennoch denkbar. ER- und Mitochondrienzielsteuerungssignale sind sich sehr ähnlich und es hängt möglicherweise von der untersuchten Zelllinie oder dem untersuchten Gewebe ab, ob Sgk1 mit dem ER oder der äußeren Mitochondrienmembran assoziiert (Kanaji *et al.*, 2000). Darüberhinaus gibt es Proteine wie Bcl-2 (*B-cell lymphocytic-leukaemia proto-oncogene 2*), die über einen hydrophoben Abschnitt sowohl auf der Außenseite des ER als auch der Mitochondrien lokalisiert sind (Janiak *et al.*, 1994).

4.3 Membranassoziation und Degradation von Sgk1

Obwohl für den Sequenzbereich zwischen den Aminosäuren 17 und 33 ein Zielsteuerungsmotiv für den Mitochondrienimport vorhergesagt wurde (vergleiche Kapitel 3.3.1 und Abbildung 3.7), handelt es sich bei diesem Bereich nicht um eine klassische mitochondriale Präsequenz, die zum Import in die Matrix führt und dort durch eine spezifische Peptidase entfernt wird.

Der hydrophobe Abschnitt ist vielmehr für eine sehr starke Interaktion mit der äußeren Mitochondrienmembran verantwortlich. Wenn die Membranassoziation von Proteinen nach einer Behandlung mit 100 mM Natriumcarbonat erhalten bleibt, gilt dies im Allgemeinen als Beweis für die Beteiligung wenigstens einer Transmembrandomäne. Die Assoziation von Sgk1 mit der äußeren Mitochondrienmembran zeigt eine Natriumcarbonat-Resistenz (vergleiche Abbildung 3.9), ohne daß Sgk1 einen Sequenzbereich hat, der für eine Transmembrandomäne in Betracht kommt. Der hydrophobe Bereich am N-Terminus, der sowohl für die Zielsteuerung, als auch für den Abbau der Kinase verantwortlich ist, ist mit neun Aminosäureresten zu kurz, um eine Membran zu durchspannen. Es kann daher nur spekuliert werden, daß über diesen Bereich eine außergewöhnlich starke periphere Membranassoziation von Sgk1 vermittelt wird.

Auch in einer anderen Arbeit wurde eine Natriumcarbonat-Resistenz von Sgk1 an Membranen beschrieben, wenn auch die Autoren hier davon ausgingen, daß es sich um die Plasmamembran handelte (Alvarez de la Rosa *et al.*, 2003; vergleiche auch Kapitel 4.2).

Darüberhinaus wurde, während der Entstehung dieser Arbeit und, nachdem die entsprechenden Ergebnisse bereits publiziert waren, von anderen Arbeitsgruppen der Zusammenhang zwischen der kurzen Halbwertzeit und der Zielsteuerung von Sgk1 bestätigt. Die Autoren der Publikationen konnten ebenfalls den Bereich, der für die beiden Merkmale des Proteins verantwortlich ist, auf die Aminosäuren 17 bis 33 (Arteaga *et al.*, 2006), bzw. 19 bis 24 (Bogusz *et al.*, 2006) einschränken.

Beim Durchsuchen des humanen Proteoms nach Proteinen, die in ihren 40 N-terminalen Aminosäuren Sequenzbereiche besitzen, die der mitochondrialen Zielsteuerungssequenz von Sgk1 ähneln, wurden insgesamt sieben Proteine mit der Sequenz GMhAh identifiziert, wobei h für Valin, Leucin, Isoleucin oder Alanin steht. Über vier der Proteine liegen keine Informationen zur subzellulären Lokalisation vor. Drei der identifizierten Proteine sind wie Sgk1 an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert: Das PKA-Ankerprotein D-AKAP1 (*dual specificity A-kinase anchoring protein*), das proapoptische Protein Bax (Bcl-2 assoziiertes X-protein) und Monoaminoxidase B (Huang *et al.*, 1999; Priault *et al.*, 2003; Greenwalt & Schaitman, 1970). Während die Monoaminoxidase B durch ihren C-Terminus in der äußeren Mitochondrienmembran verankert ist, assoziiert D-AKAP1 über seinen N-Terminus mit der äußeren Membran (Mitoma & Ito, 1992; Huang *et al.*, 1999). Für die Interaktion von Bax mit der äußeren Mitochondrienmembran sind verschiedene Mechanismen beschrieben worden (Priault *et al.*, 2003).

Grundsätzlich kommen als Erklärung für die untrennbare Verknüpfung von kurzer Halbwertzeit und mitochondrialer Zielsteuerung zwei Modelle in Betracht: Entweder Sgk1 ist so lange instabil, wie es nicht mit Mitochondrien assoziiert ist, oder das Protein wird direkt nach der Ankunft an seinem Bestimmungsort abgebaut. Beide Modelle hätten unterschiedliche Auswirkungen auf die subzelluläre

Verteilung der Kinase. Wenn Sgk1 erst durch seine Interaktion mit den Mitochondrien stabilisiert wird, so sollte das Genprodukt in Assoziation mit den Organellen akkumulieren, während es im umgekehrten Fall vor allem im Cytosol nachweisbar wäre. Bei der Mikroskopie von Sgk1-EGFP und bei der subzellulären Fraktionierung konnte Sgk1 sowohl cytosolisch als auch mitochondrial lokalisiert werden, dabei war der weit größere Teil an den Mitochondrien nachzuweisen. Diese Beobachtung spricht eher für die Annahme, daß die cytosolische Form rasch degradiert wird und Sgk1 an der äußeren Mitochondrienmembran akkumuliert. Hinzu kommt, daß die Reifung von EGFP bis zu einem Stadium, in denen es als Fluorophor wirkt, etwa zwei Stunden dauert (Lippincott-Schwartz & Patterson, 2003; Cubitt *et al.*, 1995). Das bedeutet, daß die beobachteten Fluoreszenzsignale von EGFP-Fusionsproteinen stammen, die relativ langlebig sind, und unterstützt die Theorie, daß Sgk1 an den Mitochondrien vergleichsweise stabil ist.

Die korrekte Faltung von Kinasen wie z.B. auch der zu Sgk1 verwandten PKB/Akt stellt zudem häufig hohe Ansprüche an das cytoplasmatische Proteinfaltungssystem (Young *et al.*, 2004). Somit ist zusätzlich denkbar, daß nur ein kleiner Teil translatierter Sgk1-Proteine eine korrekte Faltung erreicht, auf diese Art und Weise die cytoplasmatische Qualitätskontrolle besteht und damit der Degradation entgeht.

In einigen publizierten Arbeiten wurden Sgk1-Varianten eingesetzt, die N-terminal mit einem Affinitäts-tag oder EGFP fusioniert sind. Durch die N-terminale Fusion kann es zur Maskierung der mitochondrialen Zielsteuerungsequenz kommen. So führt z.B. die N-terminale Fusion mit EGFP zu einer rein cytosolischen Lokalisation von Sgk1 (Naray-Feyes-Tóth *et al.*, 2004). Daten, die auf der Verwendung solcher Fusionsprotein basieren, sollten daher kritisch gesehen werden.

4.4 Funktionelle Konsequenzen der mitochondrialen Lokalisation von Sgk1

Zahlreiche Arbeiten beschreiben eine Rolle von Sgk1 bei der Steuerung von Plasmamembrantransportern und Ionenkanälen (siehe Kapitel 1.6-1.9). Die mitochondriale Lokalisation von Sgk1 und die Tatsache, daß Sgk1 sowohl in dieser Arbeit, als auch von anderen Arbeitsgruppen nicht an der Plasmamembran nachgewiesen werden konnte, wirft die Frage auf, ob die beobachteten Effekte unmittelbar durch Sgk1 gesteuert werden. So ist es als zweifelhaft anzusehen, daß eine direkte Phosphorylierung von α ENaC und ROMK durch Sgk1 (Diakov & Korbmacher, 2004; Yoo *et al.*, 2003) tatsächlich *in vivo* stattfindet, zumal jeweils artifizielle Überexpressions-Systeme und *in vitro*-Experimente zur Demonstration der direkten Phosphorylierung verwendet wurden.

Die Funktion einiger Sgk1-regulierter Plasmamembrantransporter, darunter auch ENaC und ROMK, werden wesentlich durch die Ubiquitinligase Nedd4-2 bzw. das Protein NHERF2 gesteuert. Sgk1 soll seine Wirkung auf Transportprozesse an der Plasmamembran durch direkte Interaktion, bzw. Phosphorylierung der beiden regulatorischen Proteine entfalten (Debonneville *et al.*, 2001; Snyder *et al.*, 2002; Yun *et al.*, 2002a; Dieter *et al.*, 2004; Palmada *et al.*, 2004a; Böhmer *et al.*, 2003a; Böhmer

et al., 2006; Embark *et al.*, 2004a; Yun *et al.*, 2002b; Embark *et al.*, 2004b; Palmada *et al.*, 2005b). NHERF2 ist im Bereich der apikalen Plasmamembran polarisierter Zellen lokalisiert und läßt sich hier elektronenmikroskopisch an Mikrovilli und Vesikeln nachweisen (Wade *et al.*, 2003). Daher ist es fraglich, ob Sgk1 *in vivo* direkt mit NHERF2 interagiert.

Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von Nedd4-2 unter Verwendung von Antikörperfärbungen und eines EGFP-Fusionsproteins zeigen, daß sich das Protein sowohl an der Plasmamembran, als auch im Cytosol befindet (Hatanaka *et al.*, 2006; Sorkina *et al.*, 2006). Da sich die Kinasedomäne und die regulatorischen Elemente von Sgk1 auf der cytosolischen Seite der äußeren Mitochondrienmembran befinden, könnte cytosolisch lokalisiertes Nedd4-2 von Sgk1 erreicht und phosphoryliert werden. Interessant sind in diesem Zusammenhang die Befunde zweier Publikationen, die erstmalig den Einfluß von Sgk1 auf ENaC in einer Säuger-Nieren-Sammelrohrzelllinie untersuchten. Hier konnte gezeigt werden, daß die nicht mitochondrial lokalisierte Variante Sgk1 Δ 1-60 einen deutlich geringeren Einfluß auf den transepithelialen Natriumtransport hat, als Wildtyp Sgk1 (Helms *et al.*, 2003; Náráy-Fejes-Tóth *et al.*, 2004). Dieser Befund spricht für einen komplexeren Regulationsmechanismus, für den die mitochondriale Lokalisation von Sgk1 von entscheidender Bedeutung ist und paßt zu den Ergebnissen dieser Arbeit, daß NDRG1 von mitochondrial lokalisierter Sgk1 effizienter phosphoryliert wird als die Δ 1-60-Variante. Genau wie Nedd4-2 ist NDRG1 nicht an den Mitochondrien nachweisbar, auch nicht bei Überexpression von Sgk1, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die Interaktion beider Moleküle transient ist und Sgk1 keinen Einfluß auf die Lokalisation von NDRG1 hat.

Für die Steuerung der meisten Plasmamembranproteine durch Sgk1 wird kein molekularer Mechanismus vorgeschlagen. Die Daten beruhen im Wesentlichen auf heterologen Überexpressionsstudien in *Xenopus*-Oocyten und damit auf unphysiologischen Bedingungen. Zwei Erklärungen kommen für die Befunde in Betracht. Erstens könnte es durch die Überexpression oder durch ein fehlgeleitetes Proteintargeting in den Oocyten zur Phosphorylierung von Serin- oder Threonin-Resten an den regulierten Transportern kommen, die durch Sgk1 unter physiologischen Bedingungen nicht erreicht werden, sondern Substrate für verwandte Kinasen wie z.B. PKB/Akt sind. Zweitens könnte Sgk1 zentrale zelluläre Regulationsmechanismen steuern, die u.a. einen Einfluß auf bestimmte Transporter oder Ionenkanäle haben. Für diese Erklärung sprechen auch experimentelle Befunde, die die direkte Interaktion zwischen Sgk1 und Nedd4-2 in Frage stellen (Henry *et al.*, 2003; Asher *et al.*, 2003).

Die Tatsachen, daß Sgk1 durch cytosolische Kinasen aktiviert wird und cytosolische, nicht Mitochondrien-assoziierte Protein phosphoryliert, wirft die Frage auf, aus welchem Grund die Kinase mit der äußeren Mitochondrienmembran assoziiert ist. Die distinkte Lokalisation des Proteins könnte zur Herstellung einer räumlichen Nähe mit weiteren regulatorischen Faktoren und bislang nicht identifizierten Phosphorylierungstargets führen. Solche regulatorischen Faktoren könnten insbesondere auch aus Signaltransduktions- oder Stoffwechselprozessen stammen, an denen Mitochondrien beteiligt sind. Darüberhinaus könnte Sgk1 eine Rolle bei der Steuerung mitochondrialer Funktionen spielen. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Sgk1 an der Verschmelzung bzw. Teilung der Organellen beteiligt ist. Dazu wurde die Morphologie von jeweils 450 Mitochondrien mit und ohne Überexpression von Sgk1

ausgewertet (siehe Kapitel 3.7). Da sich keine signifikanten Unterschiede ergaben, ist ein Einfluß von Sgk1 auf die Biogenese der Mitochondrien unwahrscheinlich.

Mitochondrien haben auch eine Funktion als Calciumspeicher und sind über den Mechanismus der Calcium-induzierten Calciumausschüttung an der Modulation Calcium-abhängiger Signaltransduktion, sowie an der Initiation von Apoptose und Nekrose beteiligt (Hunter *et al.*, 1976; Ichas *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2003). Der mitochondriale Calciumstoffwechsel ist mit der Funktion eines spannungsabhängigen Ionenkanals verknüpft, der die äußere Mitochondrienmembran durchspannt und auf seiner cytosolischen Seite mit verschiedenen Proteinen wie Bax oder der Hexokinase interagiert (Crompton, 1999). Erste Experimente aus unserem Labor mit aufgereinigten Mitochondrien aus Wildtyp- und Sgk1-/- Tieren haben keine Unterschiede bei der Calcium-Pufferkapazität der Organellen ergeben. Da sowohl Calcium als auch Sgk1 an zahlreichen zellulären Funktionen beteiligt ist, ist es dennoch denkbar, daß Sgk1 einen Einfluß auf die intrazelluläre Calciumkonzentration hat.

Darüberhinaus wäre zu untersuchen, ob Sgk1 an der Steuerung weiterer mitochondrialer Funktionen, wie der Herstellung von ATP, der Elimination bzw. Generierung reaktiver Sauerstoffspezies und der Freisetzung proapoptotischer Faktoren, beteiligt ist.

4.5 Sgk1 hat wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Transkription von Genen

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Genchip-Analysen zur Untersuchung des Einflusses von Sgk1 auf das gesamte menschliche Genom konnten nur wenige regulierte Gene identifiziert werden. Lediglich sieben Gene zeigten eine um mehr als den Faktor 2 veränderte Expression nach Überexpression von Sgk1, die zu einer stark vermehrten Phosphorylierung von NDRG1 führt. Die Regulation eines dieser Gene, Hint3 (*histidine triad nucleotide binding protein 3*), war aus statistischen Gründen als unwahrscheinlich zu bewerten.

Darüberhinaus konnte die Sgk1-abhängige Regulation in unabhängigen Experimenten nicht bestätigt werden, wohl aber bei RT-PCRs aus den RNA-Präparationen, mit der die Genchip-Analysen durchgeführt wurden.

Wie sind die geringen Effekte und die Diskrepanzen bei der Überprüfung der Resultate zu erklären? Alle sechs Gene, die eine statistisch signifikante Veränderungen um mehr als den Faktor 2 zeigen, stehen in Zusammenhang mit immunologischen Prozessen. Mit Pentraxin-3, IL-8, IL-32 und MIP-3 α kodieren vier der Gene für sekretorische Proteine mit proinflammatorischen Funktionen (Bottazzi *et al.*, 2006; Harada *et al.*, 1994; Joosten *et al.*, 2006; Rossi *et al.*, 1997). Es ist denkbar, daß die Expression dieser Gene gekoppelt ist, oder durch die gleichen Mechanismen gesteuert werden. So könnte z.B. die niedrigere Expression von TNFRSF9, einem Mitglied der TNF α -Rezeptorfamilie zu einer veränderten TNF α -Signaltransduktion mit Einfluß auf die Genexpression TNF α -abhängiger Gene führen. Tatsächlich wird die Expression von TNFAIP3, MIP-3 α , Pentraxin-3 und Interleukin-8 durch TNF α stimuliert (Dixit *et al.*, 1990; Harant *et al.*, 2001; Fujie *et al.*, 2001; Altmeyer *et al.*, 1995; Nauta *et al.*, 2005; Strieter *et al.*, 1989) und die Promotoren von MIP-3 α und Pentraxin weisen beide Bin-

ungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF κ B, Sp1 und für Mitglieder der Ets-Familie auf (Altmeyer *et al.*, 1995; Kwon *et al.*, 2003). Die TNF α -abhängige Transcription von TNFAIP3 und Interleukin-8 wird jeweils durch NF κ B gesteuert (Krikos *et al.*, 1992; Mukaida *et al.*, 1990). Interleukin-32 wiederum stimuliert die Expression von TNF α und Interleukin-8 (Kim *et al.*, 2005; Joosten *et al.*, 2006).

Die RT-PCRs aus den RNAs, mit denen die Genchip-Analysen durchgeführt wurden, bestätigten die identifizierten Genregulationen. Damit konnte gezeigt werden, daß die Daten des *microarray*-Experiments nicht falsch positiv waren. Da sich die gefundenen Genregulationen in unabhängigen Experimenten jedoch nicht bestätigen ließen, ist davon auszugehen, daß die Effekte nicht auf die Transfektion von Sgk1 zurückzuführen sind. Auch mit Hilfe von in unserem Labor durchgeführten Luciferase-Reporter-Assays ließ sich ein Effekt von Sgk1 auf dem MIP-3 α -Promotor nicht bestätigen. Es kann spekuliert werden, daß gewisse Schwankungen in der Expression der identifizierten Gene natürlicherweise auftreten. Durch eine gekoppelte Genexpression würde dann ein Satz von Genen gleichsinnig reguliert. Wenn diese Gene zufällig in den drei Ansätzen, bei denen Sgk1 transfiziert wurde, runterreguliert sind, würden sie bei der Analyse als differentiell regulierte Gene identifiziert. Für diesen Erklärungsansatz spricht auch die Tatsache, daß der Unterschied in der Expression der identifizierten Gene relativ gering war.

Interessanterweise wurden nicht nur bei Überprüfung der Befunde in dieser Arbeit, sondern auch bei mit anderen Fragestellungen durchgeführten Genchip-Analysen gleichsinnige Regulationen der oben genannten Gene gefunden (Hess *et al.*, 2007; Varani *et al.*, 2002).

In einigen Publikationen wurde ein Einfluß von Sgk1 auf Zellzyklus und -proliferation postuliert (siehe Kapitel 1.10). Dabei soll die Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren FOXO3a und NF κ B eine Schlüsselrolle spielen (Brunet *et al.*, 2001; Mikosz *et al.*, 2001; Leong *et al.*, 2003; You *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005). Die Ergebnisse dieser Arbeit machen einen solchen Mechanismus unwahrscheinlich. Weder konnte eine betont nukleäre Lokalisation von Sgk1 nachgewiesen werden, noch scheint Sgk1 einen Einfluß auf die Transkription zu haben. Die initiale Annahme, daß FOXO3a durch Sgk1 phosphoryliert werden könnte, basierte auf der Tatsache, das FOXO3a ein Phosphorylierungstarget der verwandten Kinase PKB/Akt ist, die ebenfalls das Motiv RxRxxS/T erkennt (Brunet *et al.*, 2001). Obwohl die Phosphorylierung von FOXO3a durch Sgk1 in lebenden Zellen und *in vitro* gezeigt wurde, könnten die beobachteten Effekte auf der Überexpression von Sgk1, bzw. auf den artifiziellen *in vitro*-Verhältnissen beruhen. Möglicherweise ist Sgk1 in der Lage, FOXO3a zu phosphorylieren, ohne daß dies einen Einfluß auf die Funktion von FOXO3a als Transkriptionsfaktor hat.

Insgesamt läßt die Tatsache, daß Sgk1-Überexpression keine Veränderung des Transkriptom bewirkt, läßt einen Einfluß von Sgk1 auf den Zellzyklus oder eine antipoptotische Wirkung unwahrscheinlich erscheinen.

Zusätzlich zu der Steuerung des epithelialen Natriumkanals ENaC durch Sgk1 über die Ubiquitinligase Nedd4-2 (siehe Kapitel 1.6) wurde auch eine Genregulation der ENaC α - und β -Untereinheit beschrieben (Boyd & Naray-Feyes-Tóth, 2005). Eine veränderte Genexpression von α ENaC und β ENaC kann-

te bei den in dieser Arbeit durchgeführten Genchip-Analysen nicht sinnvoll überprüft werden, da das Expressionsniveau von α ENaC und β ENaC in HEK293 Zellen zu gering ist. Beide Gene wurden als nicht exprimiert eingestuft. α ENaC war auf den verwendeten Genchips mit drei *probe sets* und β ENaC mit einem *probe set* repräsentiert. Beide Gene zeigten nur sehr kleine, statistisch nicht signifikante Veränderungen (p-Werte für α ENaC: 0,37; 0,48; 0,69; für β ENaC: 0,86; vergleiche auch Tabelle 3.1). Die ENaC-Gene können als Beispiel für Gene angesehen werden, die möglicherweise durch Sgk1 reguliert werden, aber mit der hier durchgeführten Genchip-Analyse nicht identifiziert wurden, da ihr Expressionsniveau in HEK293 Zellen zu gering ist. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, daß Sgk1 in anderen Geweben oder Zelllinien einen Einfluß auf die Steuerung der Transkription hat.

4.6 Die Sgk1-abhängige Phosphorylierung von NDRG1 im Hippocampus

Bereits 1997 konnte in der Arbeitsgruppe Kuhl gezeigt werden, daß durch die Induktion generalisierter Krampfanfälle in Ratten zwei verschiedene Mechanismen der Sgk1-Induktion aktiviert werden (vergleiche Kapitel 1.11). Während neuronale Aktivität zu einer erhöhten mRNA-Expression v.a. in der Körnerzellschicht des Hippocampus führt, ist die erhöhte Expression in Gliazellen auf die allgemeine Stressantwort des Organismus während des Anfalls zurückzuführen. Bei adrenaletomierten Tieren blieb die Gliaantwort nach einem Krampfanfall aus. Bei Ratten, die Schwimmstress ausgesetzt waren, zeigte sich nach einer Stunde eine starke Sgk1 mRNA-Expression in den gleichen Bereichen, wie nach einem Krampfanfall mit Ausnahme der Neurone des Hippocampus (Kauselmann, 1997; siehe auch Abbildung 1.7).

Um die stressabhängige Sgk1-Antwort im Gehirn auszulösen, wurde Mäusen in dieser Arbeit das synthetische Glukokortikoid Dexamethason appliziert. Dexamethason wirkt als Agonist am Glukokortikoidrezeptor und ist etwa 30 mal stärker wirksam als das körpereigene Kortisol. Kortisol wird in der *Zona fasciculata* der Nebennierenrinde gebildet, hat zahlreiche verschiedene Funktionen im Organismus und wird u.a. bei Stress ausgeschüttet. Da die Sgk1-Expression durch Glukokortikoide stimuliert werden kann, war anzunehmen, daß die stressbedingte Hochregulation im Gehirn v.a. auf die Wirkung des Kortisols zurückzuführen ist. *In situ*-Hybridisierungen mit einer Sgk1-spezifischen Sonde zeigten jedoch, daß Sgk1 zwei Stunden nach Dexamethason-Behandlung im Vergleich zu Kontrolltieren nur im Bereich der Fimbrien und schwach in den Habenularkernen hochreguliert ist (Abbildung 3.22). Aus der Abhängigkeit der Sgk1-Stressantwort von der Funktion der Nebenniere ergibt sich damit, daß diese Komponente durch die vom Nebennierenmark ausgeschütteten Catecholamine ausgelöst wird und nicht durch Kortisol.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß NDRG1 sowohl nach neuronaler Aktivität als auch nach Gabe von Dexamethason im Hippocampus der Maus durch Sgk1 an den Resten T326, T336 und T346 phosphoryliert wird. Da unter den gleichen Bedingungen in Sgk1-/- Tieren keine Phosphorylierung von NDRG1 nachgewiesen werden konnte, ist ausschließlich Sgk1 für die Phosphorylierung dieser Reste verantwortlich. Mit diesen Ergebnissen konnten die Daten von Murray und Koautoren,

die NDRG1 als Phosphorylierungstarget von Sgk1 identifiziert hatten (Murray *et al.*, 2004), bestätigt werden.

Die nächste Fragestellung, die sich aus diesen Befunden ergab, war die nach dem Ort der Phosphorylierung von NDRG1 durch Sgk1 im Hippocampus. Da der NDRG1-Antikörper und der Phosphospezifische Antikörper nicht für Gewebefärbungen geeignet war, wurde das Expressionsmuster von NDRG1 durch *in situ*-Hybridisierung untersucht, um so auf einen potenziellen Ort für die Phosphorylierung schließen zu können. NDRG1 zeigt eine relativ homogene Expression im gesamten Gehirn. Im Hippocampus findet sich NDRG1-mRNA v.a. in den Neuronen des Gyrus dentatus, der CA1- und CA3-Region, sowie schwächer im *Stratum lacunosum moleculare*, welches Pyramidenzellen und Interneurone enthält. Für die Western Blot-Analysen zur Phosphorylierung von NDRG1 wurde nur hippocampales Gewebe verwendet. Es ist daher wahrscheinlich, daß die Sgk1-abhängige Phosphorylierung von NDRG1 in den Nervenzellen des Hippocampus erfolgt.

Obwohl sich die Sgk1-Expression im Hippocampus nach Applikation von Dexamethason nicht von der Expression unter Kontrollbedingungen unterscheidet, wird NDRG1 nach Dexamethason-Gabe genauso stark phosphoryliert, wie zwei Stunden nach einem Krampfanfall. Dieser Befund weist darauf hin, daß die Aktivität von Sgk1 im Hippocampus nicht nur von der Stärke ihrer Expression abhängt, sondern maßgeblich durch posttranslationale Modifikationen gesteuert wird. Die Phosphorylierung an verschiedenen Serin- bzw. Threoninresten ist eine Voraussetzung für die Aktivierung von Sgk1 (siehe Kapitel 1.3). Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern einen ersten Hinweis auf eine Glukokortikoid-abhängige posttranslationale Aktivierung von Sgk1, die bislang noch nicht beschrieben wurde.

Um zu untersuchen, ob Glukokortikoide auch einen Einfluß auf die aktivitätsabhängige Phosphorylierung von NDRG1 haben, könnten entsprechende Experimente mit adrenaletomierten Tieren durchgeführt werden, um den Einfluß der Nebennierenhormonen auszuschalten. Alternativ könnte ein Glukokortikoid-Antagonist wie RU486 (Mifepriston) eingesetzt werden.

Interessant wäre darüberhinaus, ob Sgk1 NDRG1 auch in anderen Regionen des Gehirns, in denen die beiden Proteine kolokalisiert sind, aktivitätsabhängig bzw. in Abhängigkeit von Glukokortikoiden phosphoryliert.

4.7 Potenzielle Funktionen von Sgk1 im Nervensystem

Mit der Phosphorylierung von NDRG1 wurde in dieser Arbeit erstmals ein Hinweis auf eine Funktion von Sgk1 im Säugetier-Gehirn gefunden. Leider ist über die zelluläre Funktion von NDRG1 praktisch nichts bekannt, so daß kaum Spekulationen über den Einfluß der Sgk1-abhängigen Phosphorylierung angestellt werden können.

Auf systemischer Ebene ist NDRG1 wichtig für die Funktion der Schwann-Zellen im peripheren Nervensystem (PNS). NDRG1^{-/-} Mäuse zeigen eine zwei Wochen nach der Geburt beginnende Demyelinisierung peripherer Nerven und eine langsam fortschreitende periphere Neuropathie (Okuda *et al.*, 2004; Berger *et al.*, 2004). Menschen, die eine Mutation im NDRG1-Gen besitzen, die zu einem Translationsabbruch an Position 148 führt, erkranken an einer hereditären sensomotorisch-

demyelinisierenden Polyneuropathie, einer Variante der Charcot-Marie-Tooth Erkrankung (CMT4D). Eine kürzlich erschienene Arbeit lieferte erste Hinweise darauf, daß bei CMT4D auch das ZNS betroffen sein kann (Echaniz-Laguna *et al.*, 2007). Zur Expression von Sgk1 im PNS gibt es bislang keine Untersuchungen, Sgk1 mRNA läßt sich jedoch stimulusabhängig in Bereichen des ZNS nachweisen, in denen auch NDRG1 exprimiert wird (siehe Abbildungen 1.7 & 3.22). Sgk1^{-/-} Mäuse erkranken nicht an einer Polyneuropathie, könnten aber dennoch sensomotorische Defizite haben, die nur mit subtilen Methoden nachzuweisen sind und die auf der fehlenden Phosphorylierung von NDRG1 beruhen. Interessanterweise führt die Mutation des Proteins *gangliosid-induced differentiation associated protein 1* (GDAP1), das auf der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist, zu CMT4A, einer sehr ähnlichen Variante der hereditären sensomotorischen Neuropathie (Niemann *et al.*, 2005).

Zahlreiche Gene, die nach neuronaler Aktivität im Hippocampus hochreguliert werden, haben eine Funktion bei Lernen und Gedächtnisbildung (siehe Kapitel 1.11). Auch für Sgk1 ist eine solche Funktion vorgeschlagen worden (Levenson *et al.*, 2004; Tsai *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2006). In ersten verhaltensbiologischen Experimenten in unserem Labor zeigten Sgk1^{-/-} Mäuse keine Lerndefizite im Vergleich zu Wildtyp Geschwistern. Hier bedarf es allerdings noch weitergehender Untersuchungen, um zu einer definitiven Aussage zu kommen. Auch gibt es inzwischen erste Hinweise darauf, daß Sgk1 zwar aktivitätsabhängig in hippocampalen Neuronen hochreguliert wird, dies aber nicht mit Prozessen der Gedächtnisbildung in Zusammenhang steht (von Hertzen & Giese, 2005).

Interessanterweise zeigte sich bei ersten in unserem Labor durchgeführten Verhaltensanalysen, daß Mäuse, die keine funktionsfähige Sgk1 exprimieren, etwas ängstlicher und antriebsloser waren (Dr. Claudia Mahlke, persönliche Mitteilung). Ein ähnlicher Phänotyp ist bereits für Sgk3^{-/-} Tiere beschrieben worden (Lang *et al.*, 2005). Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, daß die Aktivität von Sgk1 im Hippocampus durch die Gabe eines synthetischen Glukokortikoids stimuliert wird (siehe Abbildung 3.21), könnte aus dieser Beobachtung für Sgk1 eine modulatorische Funktion für die Steuerung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-(HPA-)Achse folgen. Eine inhibitorische Rolle des Hippocampus bei der Regulation des HPA-Systems wurde bereits in zahlreichen Arbeiten beschrieben. So führt die Stimulation des Hippocampus zu einer Inhibition der HPA-Achse, während die Zerstörung des Hippocampus oder seiner Afferenzen die HPA-Aktivität erhöht (Dunn & Orr, 1984; Mandel & Walter, 1963; Daniels *et al.*, 1990; Fischette *et al.*, 1980; Herman *et al.*, 1989). Die mit erhöhten Plasmakortisolspiegeln einhergehende Dysregulation des HPA-Systems wurde mit der Pathogenese depressiver Krankheitsbilder in Verbindung gebracht (Holsboer, 2000; de Kloet *et al.*, 2005; Nestler *et al.*, 2002) und in klinischen Studien bei Patienten mit ausgeprägten Depressionen konnte eine Hyperaktivität des HPA-Systems nachgewiesen werden (Holsboer & Barden, 1996; Zobel *et al.*, 1999). Sollten sich in Sgk1^{-/-} Mäusen auch erhöhte Plasmakortisolspiegel und ein fehlreguliertes HPA-System finden, könnte dies eine Erklärung für das ängstliche und antriebslose Verhalten der Tiere sein.

Chronischer Stress und dauerhaft erhöhte Plasmakortisolspiegel haben umgekehrt auch einen Einfluß auf Funktion und Struktur des Hippocampus. Tiere, die chronischem Stress ausgesetzt waren, erzielten deutliche schlechtere Leistungen in Lerntests (Conrad *et al.*, 1996; Luine *et al.*, 1994; Sunanda &

Raju, 2000). Darüberhinaus läßt sich bei Menschen mit erhöhten Plasmakortisolspiegeln und Depressionen eine Volumenverringerng des Hippocampus nachweisen (Sheline *et al.*, 1996; Starkman *et al.*, 1992; Sheline *et al.*, 2003; Sapolsky, 2000). In Nagetieren wurde eine veränderte Morphologie der neuronalen Dendriten nach chronischem Stress und Gabe von Glukokortikoiden beobachtet (Watanabe *et al.*, 1992; Sousa *et al.*, 2000; Lambert *et al.*, 1998; Magarinos *et al.*, 1998; Woolley *et al.*, 1990). Daneben haben Kortikosteroide auch einen negativ-regulatorischen Einfluß auf die adulte hippocampale Neurogenese (Cameron & Gould, 1994; Gould *et al.*, 1997; Cameron *et al.*, 1998; Cameron & McKay, 1999; Montaron *et al.*, 2003). Sgk1 soll sowohl einen Einfluß auf die Morphologie der dendritischen Fortsätze (David *et al.*, 2005), als auch auf die Steuerung des Zellzyklus haben (Mikosz *et al.*, 2001; You *et al.*, 2004; Hertweck *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005). Es könnte sich daher lohnen, in Sgk1^{-/-} Tieren nach Veränderungen der Zellmorphologie, insbesondere in der CA3-Region, oder nach Hinweisen auf einen gestörten Zellwechsel im Gyrus dentatus zu suchen.

4.8 Fazit und Ausblick

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit werden viele veröffentlichte Daten zu Sgk1 in Frage gestellt. Dies liegt zum einen daran, daß in zahlreichen Publikationen technisch nicht einwandfrei gearbeitet wurde, bzw. wichtige Kontrollexperimente fehlten. Zum anderen stellt die Arbeit mit Sgk1 v.a. wegen der Schwierigkeit des Nachweises der Proteins, aber auch wegen der insgesamt relativen hohen Hydrophobizität der Kinase, eine große Herausforderung dar. Es sei dennoch darauf hingewiesen, daß man mit verschiedenen Zelllinien und Tiermodellen durchaus zu verschiedene Ergebnissen kommen kann, und sich so mancher Widerspruch erklären könnte.

Da für Sgk1 ein Einfluß auf so viele verschiedene zelluläre Mechanismen beschrieben wurde, liegt die Annahme nahe, daß die Kinase zentrale Steuermechanismen beeinflussen könnte, die dann indirekt z.B. auf Plasmamembranproteine oder das Cytoskelett wirken. Die Ergebnisse dieser Arbeit können der Ausgangspunkt für weiterführende Untersuchungen sein, um die tatsächliche Funktion von Sgk1 aufzudecken. In diesem Zusammenhang wäre es von großer Bedeutung, mehr über die zelluläre Funktion der NDRG-Familie zu erfahren. So könnte etwa nach Interaktionspartnern von NDRG1 und darüberhinaus nach der Rolle der Phosphorylierung durch Sgk1 für diese Interaktionen gesucht werden.

Sgk1^{-/-} Mäuse unterschieden sich kaum von ihren Wildtyp-Geschwistern und die spärlichen Unterschiede in der Elektrolythomöostase zeigen sich nur nach bestimmten Diäten (Wulff *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2004; Shumilina *et al.*, 2005). Es ist daher fraglich, ob die aus *in vitro*- oder Zellkultur-Experimenten erhobene Daten zur Funktion von Sgk1 eine Relevanz *in vivo* haben. Dabei kann nicht davon ausgegangen werden, daß die Abwesenheit von Sgk1 durch andere Kinasen kompensiert wird, da z.B. NDRG1 und NDRG2 an gewissen Resten ausschließlich durch Sgk1 phosphoryliert werden. Aufgrund des milden Phänotyps ist es umso erstaunlicher, daß die Kreuzung der Sgk1^{-/-} Linie mit der Inzuchtlinie C57Bl/6 keine *knockout*-Nachkommen hervorbringt. Für die funktionelle Analyse von Sgk1

wäre es interessant zu untersuchen, in welchem Stadium sich Sgk1^{-/-} Tiere sich nicht weiterentwickeln und was dem zugrundeliegt.