

# 1. Einleitung

1.1	Die Serum und Glukokortikoid-induzierbare Proteinkinase Sgk1	2
1.2	Verschiedene Stimuli und Signaltransduktionswege führen zur unmittelbar-frühen Genexpression von Sgk1	4
1.3	Die Aktivierung der Kinase setzt die Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten voraus	5
1.4	Sgk1 wird Proteasom-abhängig degradiert	7
1.5	Die subzelluläre Lokalisation von Sgk1 unterliegt verschiedenen Einflüssen	8
1.6	Sgk1 steuert die Aktivität des epithelialen Natriumkanals ENaC	9
1.7	Sgk1 reguliert die Funktion der Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase	11
1.8	Sgk1 kontrolliert mehrere Kalium-Kanäle	12
1.9	Eine Vielzahl weitere Transporter und Kanäle wird durch Sgk1 reguliert	13
1.10	Der Einfluß von Sgk1 auf Zellproliferation und Apoptose	14
1.11	Sgk1 im Nagetiergehirn	16
1.12	Sgk1 spielt eine pathophysiologische Rolle bei einigen Erkrankungen	20
1.13	Weitere Funktionen und Phosphorylierungstargets von Sgk1	21
1.14	Die Sgk-Familie umfaßt drei Isoformen	23
1.15	Ziele dieser Arbeit	24

## 1.1 Die Serum und Glukokortikoid-induzierbare Proteinkinase Sgk1

Die Serum und Glucocorticoid-induzierbare Serin/Threonin Proteinkinase Sgk1 gehört zur Familie der AGC-Kinasen, deren gemeinsames Merkmal eine hochkonservierte katalytische Domäne ist. Zu den AGC-Kinasen gehören neben der Proteinkinase B (PKB)/Akt, der p70 ribosomalen S6 Kinase (S6K), der p90 ribosomalen S6 Kinase (RSK), der Mitogen- und Stress-regulierten Kinase (MSK) und der Proteinkinase C-verwandten Kinase (PRK) auch die Proteinkinasen A, G und C (PKA, PKC, PKG), von denen sich der Name der Familie ableitet (Parker & Parkinson, 2001; Frödin *et al.*, 2002). AGC-Kinasen sind in die Transduktion hormoneller und mitogener Signale involviert, und beeinflussen ein großes Spektrum zellulärer Funktionen, darunter Zellproliferation und –differenzierung.

Sgk1 wurde 1993 bei der Suche nach Genen, deren Transkription durch Glukokortikoide induziert wird, in einer Ratten Mammakarzinom-Zelllinie identifiziert (Webster *et al.*, 1993a). Das Sgk1-Transkript kodiert für ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 50 kDa, welches wie die anderen AGC-Kinasen über eine Serin/Threonin-Kinase Domäne mit einer Aktivierungsschleife und über ein am C-Terminus gelegenes sogenanntes hydrophobes Motiv verfügt (siehe Abbildung 1.1). Sgk1 ist phylogenetisch stark konserviert. Es wurden Homologe in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), *Drosophila melanogaster*, im Haifisch und in allen bislang untersuchten Säugern gefunden (Lang & Cohen, 2001). Humane Sgk1 wurde erstmals 1997 als ein Gen beschreiben, das durch Veränderungen des Zellvolumens hochreguliert wird (Waldegger *et al.*, 1997). Die Aminosäuresequenzen der katalytischen Domäne von Sgk1 zeigen von *C. elegans* bis zum Menschen eine erstaunlich hohe Homologie (siehe Abbildung 1.2). In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* haben die beiden Genprodukte YPK1



**Abbildung 1.1 Schematische Darstellung des Sgk1-Genproduktes.**

Die Kinasedomäne, die ATP-Bindungsdomäne, die Aktivierungsschleife und das C-terminale hydrophobe Motiv sind hervorgehoben. Die Zahlen geben die Positionen der flankierenden Aminosäurereste der entsprechenden Regionen an und beziehen sich in dieser und allen folgenden Abbildungen auf murine Sgk1.

H. sapiens	98	FHFLKVIKGSFGKVLARHKAEVIFYAVKVLQKKAILKKKEEKHIMSERNVLLKNVKHP
M. musculus	98	FHFLKVIKGSFGKVLARHKAEVIFYAVKVLQKKAILKKKEEKHIMSERNVLLKNVKHP
Haifisch	94	FNFLKVIKGSFGKVLARHKADDFIFYAVKVLQKKAILKKKEEKHIMSERNVLLKNVHP
C. elegans	100	FDYLLTIGKGSFGRVYQVRHKETKKIYAKKILSKKHIRKKNVKKHMAERNVLLNNFKHP
H. sapiens	158	FLVGLHFSFQTADKLYFVLDYINGGELFYHLQRERCFLEPRARFYAAEIASALFYLHSLN
M. musculus	158	FLVGLHFSFQTADKLYFVLDYINGGELFYHLQRERCFLEPRARFYAAEIASALFYLHSLN
Haifisch	154	FLVGLYYSFQTADKLYFVLDYINGGELFYHLQRERCSELEPRARFYAAEIASALFYLHSLK
C. elegans	160	FLVSLHFSFQNKELKLYFVLDHINGGELFSLHQREKHFSESRSRFYAAEIAACALFYLHEKN
H. sapiens	218	IVYRDLKPENILLDSQGHIVLTDGFLCKENIEHNSITSTFCGTPEYLAPEVLHKOPYDRT
M. musculus	218	IVYRDLKPENILLDSQGHIVLTDGFLCKENIEHNGTSTFCGTPEYLAPEVLHKOPYDRT
Haifisch	214	IVYRDLKPENILLDRQGHIVLTDGFLCKENIEFNGTTCFTFCGTPEYLAPEVLHKOPYDRT
C. elegans	220	IIYRDLKPENILLDDKGYIVLTDGFLCKEDMCGSKITSTFCGTPEYLAPEITLKRPYDKIT
H. sapiens	278	VDWWCLGAVLYEMLYGLPPFYSRNTAEMYDNILNKPLQLKPNIINSARHLLLEGLLQKDRT
M. musculus	278	VDWWCLGAVLYEMLYGLPPFYSRNTAEMYDNILNKPLQLKPNIINSARHLLLEGLLQKDRT
Haifisch	274	VDWWCLGAVLYEMLYGLPPFYSRNTAEMYDNILNKPLLLKPNIINSARDLLEGLLQKDRT
C. elegans	280	VDWWCLGAVLYEMIFGLPPFYSKDHNEMYDKIINQPLRLKHNISVPCSELIITGLLQKDRS
H. sapiens	338	KRLGAKDDFMEIKSHVFF
M. musculus	338	KRLGAKDDFMEIKSHIFF
Haifisch	334	KRLGAKEDFMDIKAHIFF
C. elegans	340	KRLGHRNDFRDIRDHPIFF

**Abbildung 1.2** Ein Vergleich der Proteinsequenzen von zwischen Mensch (*Homo sapiens*), Maus (*Mus musculus*), Haifisch und *Caenorhabditis elegans* zeigen eine sehr hohe Homologie im Bereich der Kinase-domänen (Aminosäurereste 98-356 in der Sequenz der Maus). Nach Lang & Cohen, 2001

und YPK2 die größte Ähnlichkeit zu Sgk1. Deletion beider Gene führt zu einem letalen Phänotyp, der durch Expression von Säuger-Sgk1 rückgängig gemacht werden kann (Casamayor *et al.*, 1999, Sun *et al.*, 2000). Sgk1 *knockout* (Sgk1<sup>-/-</sup>) Mäuse mit dem genetischen Hintergrund der Mauslinie SV129 sind vital und zeigen zunächst keinen offensichtlichen Phänotyp, der auf der Gendelektion beruht. Demgegenüber führt ein Rückkreuzen in die Mauslinie C57Bl/6 zu einem frühembryonal letalen Phänotyp.

Im Menschen und höheren Säugern lassen sich Sgk1-Transkripte in allen bislang untersuchten Geweben nachweisen (Waldegger *et al.*, 1997). Die basale Expression ist dabei je nach Gewebe eher gering und zeigt häufig ein inhomogenes Muster. So finden sich in der Niere Transkripte v.a. im distalen Tubulus und im Bereich der Sammelrohre (Lang *et al.*, 2000), im Darm ließ sich Sgk1 mRNA mit Hilfe von *in situ*-Hybridisierungen ausschließlich in den Enterozyten nachweisen (Waldegger *et al.*, 1999). Im Gehirn zeigte sich in allen bislang untersuchten Regionen eine basale Sgk1 mRNA-Expression. Dabei wurden Transkripte nicht nur in Neuronen, sondern v.a. in Oligodendrocyten und in Mikroglia gefunden (Wärntges *et al.*, 2002a; Kauselmann, 1997).

Während der murinen Embryogenese ist Sgk1 erstmals am Tag E8,5 in der Decidua und im Dottersack detektierbar. Ab Tag E9,5 finden sich Transkripte in der Herzkammer, der Lungenanlage und in größeren Blutgefäßen, bevor sie ab E13,5 auch in anderen Organen nachweisbar werden (Lee *et al.*, 2001).

Die Aktivität von Sgk1 wird auf drei verschiedenen Ebenen eng begrenzt. Im Gegensatz zu vielen anderen Kinasen wird Sgk1 stark transkriptionell reguliert (Hunter, 1995). Darüberhinaus setzt die Aktivierung der Kinase mindestens eine Phosphorylierung voraus, und sowohl die mRNA als auch das Protein haben eine sehr kurze Halbwertszeit (Webster *et al.*, 1993b; Brickley *et al.*, 2002).

## 1.2 Verschiedene Stimuli und Signaltransduktionswege führen zur unmittelbar-frühen Genexpression von Sgk1

Sgk1 ist ein unmittelbar-früh exprimiertes Gen. Die Induktion der Sgk1 mRNA-Expression erfolgt innerhalb weniger Minuten nach einem adäquaten Stimulus und erfordert keine *de novo*-Proteinbiosynthese (Webster *et al.*, 1993b). Mit Hilfe sogenannter Actinomycin D-*chase* Experimente wurde gezeigt, daß Sgk1 mRNA eine Halbwertszeit von nur rund 20 min. hat und damit zu den kurzlebigsten mRNA-Spezies gehört (Webster *et al.*, 1993b). Daraus ergibt sich, daß Sgk1 sehr rasch nach einem Stimulus exprimiert wird und die Expression nur relativ kurz aufrecht erhalten wird.

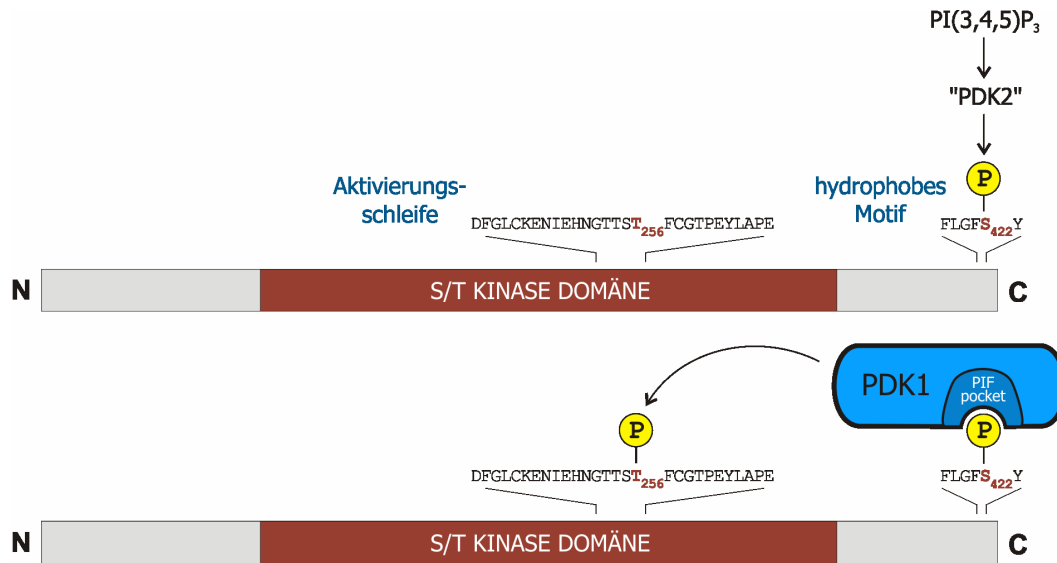
Die Transkription von Sgk1 wird, je nach Gewebe bzw. untersuchter Zelllinie, von einer Vielzahl verschiedener Stimuli induziert. Der Sgk1 Promotor enthält ca. 1000 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts eine Bindungsstelle für den Glukokortikoidrezeptor (*glucocorticoid response element*, GRE), über die die Induktion durch Glukokortikoide in zahlreichen Geweben vermittelt wird (Webster *et al.*, 1993b; Maiyar *et al.*, 1997; Naray-Fejes-Toth *et al.*, 2000; Itani *et al.*, 2002). Das Tumorsuppressorprotein p53 stimuliert die Sgk1-Promotoraktivität durch Bindung an einen Bereich zwischen den bp -1380 und -1345 oberhalb des Transkriptionsstarts in Mammaepithelzellen aus der Ratte. Interessanterweise führt die Bindung von p53 an den Sgk1 Promotor nicht nur zu einer starken Zunahme der Transkription, sondern auch zu einem reduzierten Ansprechen auf Glukokortikoide (Maiyar *et al.*, 1996, Maiyar *et al.*, 1997). In Geweben, in denen der Mineralokortikoidrezeptor exprimiert wird, steht die Transkription von Sgk1 zusätzlich unter dem Einfluß von Aldosteron. Dies ist insbesondere im distalen Tubulus und Sammelrohr der Niere der Fall, aber auch im distalen Colon und im Trophoblasten (Naray-Fejes-Toth *et al.*, 1999; Hou *et al.*, 2002; Brennan und Fuller, 2000; Shigaev *et al.*, 2000; Driver *et al.*, 2003). Die genaue Mineralokortikoidrezeptor-Bindungsstelle am Sgk1-Promotor ist nicht bekannt. Ebenfalls in Sammelrohrzellen aus der Niere wurde gezeigt, das der Ligandenabhängige Transkriptionsfaktor *peroxisome proliferator-activated receptor*  $\gamma$  die Transkription von Sgk1 stimulieren kann (Hong *et al.*, 2003).

Da die Transkription von Sgk1 durch Serum induziert wird, ist anzunehmen, daß bestimmte Bestandteil des Blutserums zur Expression von Sgk1 führen. Tatsächlich wurde eine ganze Reihe von Faktoren und Hormonen mit Einfluß auf die Genexpression von Sgk1 beschrieben. Darunter ist mit Heparin auch ein Faktor, der zur Suppression der Sgk1-Transkription führt (Delmolino & Castellot, 1997). Alle anderen untersuchten Faktoren, wie etwa Follikelstimulierendes Hormon (FSH), Luteinisierendes Hormon (LH), *transforming growth factor*- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Granulozyten- und Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor (GM-CSF), Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF), *platelet derived growth factor* (PDGF) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) erhöhen die Transkription von Sgk1 (Alliston *et al.*, 1997;

Alliston *et al.*, 2000; Waldegger *et al.*, 1999; Mizuno & Nishida, 2001; Cowling & Birnboim, 2000). Zu den Signaltransduktionsmechanismen, über die die oben genannten Faktoren zur Transkription von Sgk1 führen, ist vergleichsweise wenig bekannt. Die Daten von Alliston und Koautoren legen nahe, daß die Wirkungen von FSH über den PKA-Signalweg vermittelt werden, da sowohl FSH, als auch der PKA-Aktivator Forskolin über die Bindung der Transkriptionsfaktoren Sp1 und/oder Sp3 an eine GC-reiche Region ca. 50 bp oberhalb des Transkriptionsstarts die Induktion von Sgk1-mRNA bewirken (Alliston *et al.*, 1997). FGF und PDGF führen in murinen Fibroblasten über eine Aktivierung des MAP- (*mitogen activated protein*) Kinase Signalweges zur Transkription von Sgk1 (Mizuno & Nishida, 2001). Neben Hormonen und Wachstumsfaktoren führen zahlreiche allgemeine Stress-Stimuli zur Expression von Sgk1-mRNA. In einer Mammakarzinom-Zelllinie wurde gezeigt, daß Sgk1 nach oxidativem Stress, UV-Bestrahlung, hyperosmotischem Stress und nach einem halbstündigen Hitzeschock hochreguliert wird (Leong *et al.*, 2003). Für die Induktion nach hyperosmotischem Stress, bzw. nach isotonomischer Verringerung des Zellvolumens scheinen ebenfalls MAP-Kinasen und möglicherweise auch der Transkriptionsfaktor Sp1 eine Rolle zu spielen (Bell *et al.*, 2000; Waldegger *et al.*, 1997; Waldegger *et al.*, 2000). Auch hypotoner Stress kann zur Expression von Sgk1 führen (Rozansky *et al.*, 2002). Im Gehirn der Ratte wurde eine erhöhte Sgk1 mRNA-Expression nach Traumata des Zentralnervensystems (ZNS) und nach Excitotoxizität nachgewiesen (Imaizumi *et al.*, 1994; Hollister *et al.*, 1997). Darüberhinaus steht die Expression im Zusammenhang mit weiteren pathophysiologischen Mechanismen (s. Kapitel 1.12)

### 1.3 Die Aktivierung der Kinase setzt die Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten voraus

Ohne posttranslationale Modifikation zeigen die Kinasen der AGC-Familie nur sehr geringe enzymatische Aktivität (Parker & Parkinson, 2001). So wie die meisten AGC-Kinasen besitzt auch Sgk1 je ein stark konserviertes Phosphorylierungsmotiv am C-Terminus und im Bereich der katalytischen Domäne. Das Phosphorylierungsmotiv im Bereich der Kinasedomäne befindet sich in der sogenannten Aktivierungsschleife (*activation loop*) und wurde erstmals bei PKB/Akt als Phosphorylierungstarget für die 3-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase-1 (PDK1) identifiziert (Alessi *et al.*, 1997; Stokoe *et al.*, 1997). PDK1 ist Bestandteil des 3-Phosphoinositid (PI3)-Signaltransduktionsweges, der u.a. durch Insulin und andere Wachstumsfaktoren aktiviert wird und über die PI3-Kinase zur Generierung der *second messenger* Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PI(3,4,5)P<sub>3</sub>) und Phosphatidylinositol-3,4-Biphosphat (PI(3,4)P<sub>2</sub>) führt (Vanhaesebroek & Alessi, 2000). Sgk1 wird in seiner Aktivierungsschleife durch PDK1 an T256 phosphoryliert und dadurch aktiviert. PI3K-Inhibitoren wie Wortmannin oder LY294002 unterdrücken die durch Insulin, den Hepatozytenwachstumsfaktor HGF oder den *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) induzierte PDK1-abhängige Aktivierung von Sgk1 (Kobayashi & Cohen, 1999a; Shelly & Herrera, 2002; Park *et al.*, 1999). Voraussetzung für diese Reaktion ist jedoch eine weitere Phosphorylierung an S422 im Bereich des C-terminalen sogenannten hydrophoben Motifs. Erst wenn S422 phosphoryliert ist, bindet PDK1 über seine PDK1 *interacting fragment* (PIF)-bindende



**Abbildung 1.3 Aktivierung von Sgk1 durch Phosphorylierung an S422 und T256.**

Zunächst wird S422 durch eine Kinase phosphoryliert, die gelegentlich als PDK2 bezeichnet wird und durch  $PI(3,4,5)P_3$  aktiviert wird. Bei PDK2 handelt es sich wahrscheinlich um den rictor-mTOR-Komplex, einen Komplex aus wenigstens zwei Proteinen (Sarbassow *et al.*, 2005; Hresko & Mueckler, 2005; Jacinto *et al.*, 2006). Das phosphorylierte hydrophobe Motif wird von PDK1 mit Hilfe einer als PIF bindenden Tasche (*PIF pocket*) bezeichneten Domäne gebunden. PDK1 phosphoryliert Sgk1 an T256 und löst sich ab, worauf Sgk1 eine Konformationsänderung erfährt und aktiviert wird.

Tasche (Biondi *et al.*, 2000) an Sgk1 und phosphoryliert T256 (Biondi *et al.*, 2001; Frödin *et al.*, 2002). Der Mechanismus der Aktivierung von Sgk1 ist in Abbildung 1.3 dargestellt.

Damit unterscheiden sich die Aktivierungsmodi von Sgk1 und PKB/Akt, obwohl beide durch PDK1 aktiviert werden. Im Gegensatz zu Sgk1 besitzt PKB/Akt eine Pleckstrin Homologie (PH)-Domäne an seinem N-Terminus, über die die Kinase mit  $PI(3,4)P_2$  und  $PI(3,4,5)P_3$  interagiert und so an die Plasmamembran rekrutiert werden kann. PDK1 besitzt ebenfalls eine solche Domäne, und gelangt dadurch in enge räumliche Nähe zu PKB/Akt. Die Funktionalität der PIF-bindende Tasche von PDK1 ist deshalb für die Aktivierung von PKB/Akt nicht notwendig (Biondi *et al.*, 2001). Chun und Koautoren schlagen für die Aktivierung von Sgk1 einen Mechanismus vor, bei dem Sgk1 über seinen C-Terminus das Adapterprotein NHERF2 (*Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor 2*) bindet, welches seinerseits über eine PIF-Domäne mit PDK1 interagiert. Auf diese Weise könnten, ähnlich wie bei der Aktivierung von PKB/Akt, PDK1 und Sgk1 in räumliche Nähe zueinander gebracht werden (Chun *et al.*, 2002)

Das hydrophobe Motiv am C-Terminus der AGC-Kinasen hat die Konsensussequenz F-x-x-F-S/T-F/Y, und wird im Falle von MSK und RSK durch ihre C-terminalen Kinasedomänen autophosphoryliert (Vik & Ryder, 1997; Deak *et al.*, 1998). Die Kinase, die Serin- bzw. Threoninreste im hydrophoben Motiv von Sgk1, PKB/Akt und S6K phosphoryliert, konnte bisher noch nicht identifiziert werden. Die Phosphorylierung kann jedoch ebenfalls durch Wortmannin inhibiert werden, weshalb die Kinase manchmal als PDK2 bezeichnet wird. Interessanterweise hat PRK an Stelle eines Serins oder Threo-

nins einen Aspartatrest im Bereich des hydrophoben Motivs, der durch seine negative Ladung eine Phosphorylierung vortäuscht. Tatsächlich führt auch bei Sgk1 der Austausch S422D im hydrophoben Motiv zu einer stark gesteigerten Kinaseaktivität (Park *et al.*, 1999). Die S422D-Variante wird experimentell als konstitutiv aktive Variante eingesetzt.

Die PDK1-abhängige Phosphorylierung ist der mit Abstand am besten charakterisierte Aktivierungsmodus von Sgk1. Daneben wurden noch weitere, durch andere Kinasen katalysierte Phosphorylierungen zur Aktivierung von Sgk1 beschrieben. In COS-7 Affenierenkarzinomzellen wurde gezeigt, daß über-exprimierte humane Sgk1 von PKA an T369 phosphoryliert und ihre Aktivität damit zweifach gesteigert wird. Ein Aminosäureaustausch T369A verhindert die durch zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) auslösbare Aktivierung von Sgk1 (Perrotti *et al.*, 2001). T369 ist jedoch nicht Bestandteil einer perfekten Konsensussequenz für die Erkennung durch PKA und eine cAMP-abhängige Aktivierung von Sgk1 konnte von anderen Gruppen experimentell nicht bestätigt werden (Shelly & Herrera, 2001; Lang & Cohen, 2001).

Bei der Suche nach Interaktionspartnern der *extracellular signal-regulated protein kinase 5* (ERK5, Synonym: BMK1) mit Hilfe eines *Yeast-Two-Hybrid screens* wurde Sgk1 als Phosphorylierungstarget dieser MAP-Kinase identifiziert (Hayashi *et al.*, 2001). ERK5 phosphoryliert Sgk1 an S78 und aktiviert damit die Kinase unabhängig von PDK1, da auch eine S422A-Variante von Sgk1 durch ERK5 aktiviert werden kann (vergleiche Abbildung 1.3).

Zwei weitere PDK1-unabhängige Aktivierungsmechanismen wurden für Sgk1 beschrieben. Intergrin-medierte Zelladhäsion soll genauso zur Aktivierung von Sgk1 führen (Shelly & Herrera, 2001) wie hohe intrazelluläre Calcium-Konzentrationen. Während der erste Aktivierungsweg nicht näher charakterisiert wurde, soll die Wirkung von intrazellulärem Calcium durch die Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase Kinase (CaMKK) vermittelt werden, die Sgk1 direkt phosphoryliert (Imai *et al.*, 2003).

## 1.4 Sgk1 wird Proteasom-abhängig degradiert

Nicht nur die Sgk1-mRNA, sondern auch das Sgk1-Genprodukt weist eine sehr kurze Halbwertszeit auf. So ist das Sgk1 Protein trotz hoher mRNA-Expression kaum nachweisbar. Neben der transkriptionellen Regulation und der Aktivierung durch Phosphorylierung ist die Kurzlebigkeit des Sgk1 Proteins ein weiterer Faktor, der die Aktivität der Kinase begrenzt. Die Halbwertszeit von Sgk1 wurde von Brickley *et al.* (2002) mit weniger als 30 Minuten angegeben. Sgk1 wird polyubiquitiniert und durch das Proteasom degradiert. Dabei findet sich ubiquitinierte Sgk1 bevorzugt membranassoziiert, während nichtubiquitinierte Sgk1 im Cytosol dominiert. Die Information für den raschen Abbau von Sgk1 wird in den ersten 60 Aminosäuren des Proteins kodiert und die Ubiquitinierung von N-terminalen Lysinresten bewirkt die proteasomale Degradation (Brickley *et al.* 2002; Bogusz *et al.*, 2006). Weder die Aktivierung von Sgk1 durch Phosphorylierung, noch die Elimination der Kinaseaktivität durch Mutation der ATP-Bindungsstelle haben einen Einfluß auf die Halbwertszeit des Proteins (Bogusz *et al.*, 2006).



Erst kürzlich wurde gezeigt, daß die E3 Ubiquitinligase Nedd4-2 zumindest partiell an der Ubiquitinierung und damit der Degradation von Sgk1 beteiligt ist, wenn beide Proteine zusammen in COS-7 Zellen überexprimiert werden (Zhuo & Snyder, 2005; siehe auch Kapitel 1.6).

## 1.5 Die subzelluläre Lokalisation von Sgk1 unterliegt verschiedenen Einflüssen

Die subzelluläre Lokalisation von Sgk1 und deren Regulation sind Gegenstand zahlreicher Arbeiten. Es wurde gezeigt, daß Sgk1 an der inneren Seite der Plasmamembran, am Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern und im Cytoplasma lokalisiert ist. Der Transit zwischen Zellkern und Cytoplasma unterliegt dabei bestimmten externen Stimuli und ist mit bestimmten Zellzyklusphasen assoziiert. Wird die Ratten-Mammakarzinom-Zelllinie Con8.dh6 mit Serum behandelt und damit zur Proliferation angeregt, so läßt sich Sgk1 mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen im Zellkern nachweisen, während sich die Kinase nach Arretierung der Zellen in der G1-Phase durch Zugabe des synthetischen Glukokortikoids Dexamethason hauptsächlich im Cytosol befindet (Buse *et al.*, 1999). Darüberhinaus haben cytometrische Untersuchungen, bei denen gleichzeitig der DNA-Gehalt und die Lokalisation von Sgk1 in einzelnen Zellen gemessen wurde, ergeben, daß sich Sgk1 während der S-, G2 und M-Phase hauptsächlich im Zellkern befindet und sich während der G1-Phase nur im Cytoplasma nachweisen läßt (Buse *et al.*, 1999). Im Ovar der Ratte konnte mit Immunhistochemie und Immunfluoreszenz gezeigt werden, daß sich Sgk1 in Granulosazellen wachsender Follikel ausschließlich im Zellkern befindet. Nach der terminalen Differenzierung in Gelbkörperzellen war Sgk1 nur noch cytoplasmatisch detektierbar (Alliston *et al.*, 2000; Gonzalez-Robayna *et al.*, 1999). Neben Dexamethason führt auch hyperosmotischer Stress zu einer cytoplasmatischen Lokalisation, während sich Sgk1 nach Hitzeschock, UV-Bestrahlung und oxidativem Stress hauptsächlich im Zellkern nachweisen läßt



**Abbildung 1.4** Das putative Kernlokalisierungssignal (NLS) von Sgk1 liegt im Bereich der Kinasedomäne.

(Leong *et al.*, 2003). Bei einem *Yeast Two-Hybrid Screen* wurde 2003 der Kernimportfaktor Importin- $\alpha$  als Interaktionspartner von Sgk1 identifiziert (Maiyar *et al.*, 2003). Importin- $\alpha$  bindet an ein im Bereich der Kinasedomäne zwischen den Aminosäureresten 131-141 gelegenes Kernlokalisierungssignal (siehe Abbildung 1.4) und vermittelt in *in vitro*-Experimenten den Transfer von Sgk1 in den Zellkern (Maiyar *et al.*, 2003).

Eine Lokalisation von Sgk1 an der Plasmamembran wurde erstmals 2002 postuliert. Brickley und Kollegen fanden Sgk1 in Membranpräparationen von SK-BR-3 Mammacarcinom Zellen und konnten durch konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie eine Kolokalisation von Sgk1 mit dem Plasma-



membranprotein  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase nachweisen. Mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie wurde die Kollokalisierung von Sgk1 mit  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase an der basolateralen Membran von Nierenepithelzellen in Schnitten von Rattennieren bestätigt. Alvarez del la Rosa *et al.* benutzten für diese Studien ein selbst generiertes  $\alpha$ Sgk1 Antiserum, mit dem sie außerdem in biochemischen Experimenten Sgk1 in Membranpräparationen aus Nierengewebe nachwiesen (Alvarez del la Rosa *et al.*, 2003a). Dasselbe Antiserum wurde für den Nachweis von Sgk1 in Schnitten des Intestinaltraktes von Ratten verwendet. Auf der Basis dieser Daten wurde eine Lokalisation an der basolateralen Membran von Enterocyten postuliert (Coric *et al.*, 2004).

Bogusz und Koautoren demonstrieren mit Hilfe konfokaler Mikroskopie in COS-7 Zellen, daß Sgk1-GFP Fusionsproteine mit dem ER-Protein Calnexin kollokalisieren und folgern, daß Sgk1 mit dem ER assoziiert. Die Bindung an das ER soll durch das im Bereich des N-Terminus gelegene hydrophobe Hexapeptid GMVAIL vermittelt werden (Bogusz *et al.*, 2006). Interessanterweise zeigen die Autoren dieser Arbeit, daß ein Sgk1-GFP Fusionsprotein, aus dem das hydrophobe Motif entfernt wurde, hauptsächlich im Zellkern lokalisiert ist.

## 1.6 Sgk1 steuert die Aktivität des epithelialen Natriumkanals ENaC

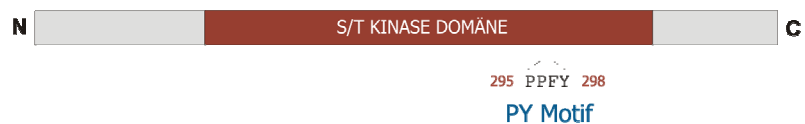
Das von der Nebennierenrinde sezernierte Steroidhormon Aldosteron ist ein wesentlicher Bestandteil im Regulationssystem der Salz- und Flüssigkeitshomöostase, indem es die Reabsorption von Natrium und die Sekretion von Kalium v.a. im distalen Nierentubulus und im renalen Sammelrohr bewirkt. Dabei kann zwischen einer Lang- und einer Kurzzeitwirkung von Aldosteron unterschieden werden. Dauerhaft hohe Plasma-Aldosteronkonzentrationen, wie sie etwa durch eine Nidrigsalz-Diät erreicht werden können, führen an Nierenepithelzellen zu einer Vermehrung der Mitochondrien, sowie einer Vergrößerung der basolateralen Membran (Wade *et al.*, 1990). Diese Veränderungen lassen sich durch einen dauerhaft erhöhten Energiebedarf für die oben beschriebenen Transportprozesse erklären, die letztlich von der Aktivität der basolateralen  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase abhängen (siehe auch Kapitel 1.7).

Ein kurzzeitiger Anstieg des Plasma-Aldosterons führt innerhalb einer Stunde zu einem Transkriptions- und Translations-abhängigen Anstieg der Natriumreabsorption und zur Kaliumausscheidung im distalen Nephron (El Mernissi & Doucet, 1983; Horisberger & Diezi, 1983). Auf der luminalen Seite der Nierenepithelzelle ist der aus zwei  $\alpha$ , und je einer  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit bestehende epitheliale Natriumkanal ENaC (*epithelial sodium channel*) für die Natriumrückresorption verantwortlich, auf der basolateralen Seite wird Natrium durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in Interstitium und Blutplasma transportiert. Der Natriumexport durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase liefert gleichzeitig die treibende Kraft für die apikale Natriumrückresorption durch ENaC. Der Kurzeiteffekt von Aldosteron bewirkt erstens eine gesteigerte Genexpression der ENaC  $\alpha$ -Untereinheit, zweitens eine Translokation von ENaC-Kanälen aus einem intrazellulären Kompartiment zur apikalen Zelloberfläche (Loffing *et al.*, 2001) und drittens eine erhöhte Transkription und basolaterale Oberflächenexpression der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Verrey *et al.*, 1989; Summa *et al.*, 2001).

Die Anzahl von ENaC-Kanälen auf der apikalen Zelloberfläche von Transportepithelien wird maßgeblich durch die Ubiquitinligase Nedd4-2 gesteuert. Nedd4-2 interagiert über zwei seiner vier WW-Domänen mit PY-Motiven an den cytoplasmatischen Carboxy-Termini der ENaC Untereinheiten, ubiquitiniert die ENaC-Untereinheiten und bewirkt so deren Internalisierung (Staub *et al.*, 1997; Kamynina *et al.*, 2001; Snyder *et al.*, 2004). Durch den Einfluß von Aldosteron wird dieser Mechanismus inhibiert und die Anzahl der Plasmamembran-ständigen Natriumkanäle steigt an. Wird Nedd4-2 mit Hilfe von siRNA ausgeschaltet, so bewirkt die Zugabe von Kortikoiden zu derart modifizierten Zellen keine Veränderungen des Natriumstroms mehr (Snyder *et al.*, 2004).

Kurz nachdem Sgk1, dessen Expression in der Niere stark unter dem Einfluß von Aldosteron steht (vergleiche Kapitel 1.2), als ein Schlüsselmolekül bei der Signaltransduktion der Wirkung von Aldosteron auf ENaC identifiziert worden war (Alvarez de la Rosa *et al.*, 1999), wurde von zwei Gruppen unabhängig voneinander der zugrunde liegende Mechanismus aufgedeckt. Sgk1 verfügt ebenfalls über ein PY-Motiv (vergleiche Abbildung 1.5), mit dem es an die WW-Domänen von Nedd4-2 binden kann, um Nedd4-2 an wenigstens einem Serin-Rest zu phosphorylieren. Derart phosphoryliertes Nedd4-2 kann nicht mehr an ENaC binden, so daß ENaC nicht ubiquitiniert wird und länger an der Plasmamembran verbleibt (Debonneville *et al.*, 2001; Snyder *et al.*, 2002). Die Phosphorylierung von Nedd4-2 durch Sgk1 führt zur Bindung von regulatorischen 14-3-3-Proteinen an den Bereich von Nedd4-2, der für die Bindung von ENaC essentiell ist. Auf diese Art und Weise wird die Interaktion von Nedd4-2 und ENaC unterbunden (Ichimura *et al.*, 2005; Bhalla *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2006; Nagaki *et al.*, 2006). Die Koinzidenz zwischen Aldosteron-abhängiger Sgk1-Expression und Nedd4-2 Phosphorylierung wurde später in einer murinen Nieren-Sammelrohr-Zelllinie und *in vivo* bestätigt (Sandra Y. Flores *et al.*, 2005).

**Abbildung 1.5** Ein PY-Motif, über das Sgk1 an die WW-Domäne von ENaC-Untereinheiten binden kann, liegt im Bereich der Kinasedomäne



In der *Xenopus* Nierenepithelzelllinie A6 konnte zusätzlich gezeigt werden, daß Sgk1 auch bei der Insulin- und Antidiuretisches Hormon (ADH)-vermittelten Natriumrückresorption über ENaC eine Rolle spielt (Faletti *et al.*, 2002; Alvarez de la Rosa & Canessa, 2003b). Alvarez de la Rosa und Canessa beobachteten bei diesen Untersuchungen gleichzeitig, daß Sgk1 bei der Aldosteron-vermittelten Regulation von ENaC eine eher geringe Rolle spielt. Tatsächlich gibt es weitere Arbeiten, die die Interaktionen zwischen Sgk1, Nedd4-2 und ENaC teilweise in Frage stellen, bzw. zusätzliche Mechanismen vorschlagen. So konnten in A6-Zellen weder nach Zugabe von Aldosteron noch nach Expression konstitutiv aktiver Sgk1 eine verlängerte Halbwertszeit von ENaC in der apikalen Plasmamembran festgestellt werden (Alvarez de la Rosa *et al.*, 2002; Alvarez de la Rosa *et al.*, 2003c). Mit Hilfe von Oberflächen-Plasmonresonanz-Messungen wurde keine bzw. nur eine sehr schwache Bindungsinteraktionen

zwischen Sgk1 und den WW-Domänen von Nedd4-2 nachgewiesen (Henry *et al.*, 2003; Asher *et al.*, 2003).

Bei Messungen in *Xenopus* Oocyten zeigte sich, daß Sgk1-Überexpression die Natriumleitfähigkeit um den Faktor 2,5 erhöht (Vuagniaux *et al.*, 2002). Ebenfalls in *Xenopus* Oocyten wurde gezeigt, daß die Zugabe konstitutiv aktiver Sgk1 die Natriumleitfähigkeit von ENaC unabhängig von Nedd4-2 über die direkte Phosphorylierung einer Sgk1-Konsensussequenz am C-Terminus der ENaC- $\alpha$ -Untereinheit positiv beeinflusst (Diakov & Korbmacher, 2004). Ob die  $\alpha$ -Untereinheit durch Sgk1 selbst oder indirekt phosphoryliert wird, wurde dabei nicht geklärt. In einer Untersuchung, in der biochemische mit biophysikalischen und mathematischen Methoden kombiniert wurden, konnte eine Sgk1-abhängige Phosphorylierung von ENaC-Untereinheiten nicht nachgewiesen werden. Es wurde jedoch festgestellt, daß Sgk1 (1) die Öffnungswahrscheinlichkeit für ENaC erhöht, (2) die Dichte der Untereinheiten in der apikalen Zellmembran und in intrazellulären Kompartimenten erhöht und (3) präexistente ENaC-Untereinheiten aktiviert (Alvarez de la Rosa *et al.*, 2003c).

Einen Einfluß von Sgk1 auf die Transkription der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Untereinheit des epithelialen Natriumkanals legt eine Arbeit von Boyd und N  ray-Feyes-T  th nahe. Nach der Transfektion von Sgk1 in die murine Sammelrohrzelllinie M1 war die Transkription der entsprechenden mRNAs deutlich hochreguliert, wohingegen die Transfektion der inaktiven Sgk1-Variante K127M die Transkription im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen verringerte (Boyd & N  ray-Feyes-T  th, 2005).

Neben Sgk1 spielt möglicherweise auch PKA eine Rolle bei der Regulation von Nedd4-2. Nach Stimulation durch cAMP können durch PKA die gleichen Serin bzw. Threonin-Reste von Nedd4-2 phosphoryliert werden wie durch Sgk1, so daß unter Umständen zwei konvergente Mechanismen zur Steuerung von ENaC via Nedd4-2 realisiert sind (Snyder *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2004). Jedoch konnte in A6-Zellen auch für PKA kein Einfluß auf ENaC nachvollzogen werden (Arteaga & Canessa, 2005).

Die Mechanismen, über die Sgk1 die Natriumreabsorption im distalen Nierentubulus und Sammelrohr beeinflusst, sind also noch nicht zweifelfrei und vollständig geklärt. Anhand von Sgk1-/- Mäusen, bei denen die Kinasedomäne von Sgk1 aus dem Genom entfernt wurde, lässt sich jedoch im Mausmodell die physiologische Rolle abschätzen, die Sgk1 bei der Regulation der Wasser- und Salzhom  ostase spielt (Wulff *et al.*, 2002). Bei normaler Diät unterscheiden sich Körpergewicht, glomeruläre Filtrationsrate, Blutdruck und die Zusammensetzung des Urins zwischen Sgk1-/- Tieren und Wildtypmäusen nicht. Einzig der Plasma-Aldosteronspiegel ist bei Sgk1-/- Mäusen leicht erhöht, was auf einen kompensatorischen Mechanismus hinweisen könnte. Unter Natrium-armer Diät jedoch zeigen Sgk1-/- Tiere ein vermindertes Vermögen zur Natriumreabsorption, das mit einem Natriumverlust und schließlich mit einem Gewichtsverlust und einer verminderten glomerulären Filtrationsrate einhergeht.

## 1.7 Sgk1 reguliert die Funktion der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase

Die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase ist ein Antiporter, der unter Energieverbrauch in Form eines ATP-Moleküls gleichzeitig drei Natriumionen aus der Zelle exportiert und zwei Kalium-Ionen importiert. Die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase ist damit maßgeblich an der Aufrechterhaltung des zellulären Membranpotenzials beteiligt und liefert

gleichzeitig die treibende Kraft für die meisten Transportprozesse in Epithelien, wie z.B. den Natriumstrom durch ENaC an der apikalen Zellmembran des distalen Nierentubulus und Sammelrohres (vergleiche Kapitel 1.6).

Der Einfluß von Sgk1 auf die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase wurde in verschiedenen zellulären Systemen untersucht. Mit Hilfe von elektrophysiologischen Untersuchungen an *Xenopus* Oocyten, die mit konstitutiv aktiver, bzw. inaktiver Sgk1 transfiziert worden waren, konnte ein stimulierender Einfluß von Sgk1 auf die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase gezeigt werden (Setiawan *et al.*, 2002). Dieser Effekt basiert wahrscheinlich hauptsächlich auf einer erhöhten Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Zelloberflächenexpression (Zecevic *et al.*, 2004). Damit könnte Sgk1 der Mediator des seit langem bekannten positiven Einflusses von Aldosteron auf die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase sein (Verrey *et al.*, 2003). In einer modifizierten A6 *Xenopus* Nierenzelllinie, die eine Tetracyclin-induzierbare konstitutiv aktive Sgk1-Variante besitzt, wurde erst 6-24 Stunden nach der Induktion der Expression von Sgk1 eine 2,5-fach erhöhte Aktivität der basolateralen Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase gemessen. Dabei wurde auch gezeigt, daß die Induktion durch Sgk1 und Aldosteron unabhängig voneinander sind, und daß Sgk1 ausschließlich die Aktivität der Kanäle erhöht, während durch Aldosteron die Anzahl der Kanalproteine in der Plasmamembran gesteuert wird (Alvarez de la Rosa *et al.*, 2006).

## 1.8 Sgk1 kontrolliert mehrere Kalium-Kanäle

Neben einer Störung der Natriumreabsorption im distalen Nephron zeigen Sgk1<sup>-/-</sup> Mäuse auch eine gestörte Anpassung der Kaliumausscheidung nach akuter oder chronischer Kaliumbelastung (Huang *et al.*, 2004). Die Aldosteron-abhängige Kaliumausscheidung im distalen Nierentubulus erfolgt durch den äußeren medullären Kaliumkanal ROMK (*renal outer medullary K<sup>+</sup> channel*), und ist elektrochemisch abhängig von der Funktion von ENaC und der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Bei der Untersuchung der Ursache für die beeinträchtigte Fähigkeit zur Kaliumausscheidung in Sgk1<sup>-/-</sup> Tieren zeigte sich dann auch, daß diese eher nicht auf einer direkten Fehlregulation von ROMK, sondern auf die bereits weiter oben erörterten Fehlsteuerungen von ENaC und der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase zurückzuführen sind (Huang *et al.*, 2004; vergleiche Kapitel 1.6 & 1.7). Dennoch gibt es einige Arbeiten, in denen gezeigt wird, daß die Funktion von ROMK direkt von Sgk1 kontrolliert wird. Yoo und Koautoren demonstrieren mit Hilfe von *in vitro*-Phosphorylierungsexperimenten, Messungen an Oocyten und Koexpressionsstudien in COS7-Zellen, daß die Zelloberflächenexpression von ROMK, und damit auch die Anzahl funktionsfähiger Kanäle, nach der Phosphorylierung eines Serinrestes durch Sgk1 stark erhöht wird (Yoo *et al.*, 2003). In zwei weiteren Arbeit wurde ebenfalls ein Einfluß von Sgk1 auf die Oberflächenexpression von ROMK in Oocyten gezeigt, jedoch war diese streng abhängig von der Bindung von Sgk1 an die zweite PDZ-Domäne von NHERF2 (Yun *et al.*, 2002a; Palmada *et al.*, 2003; vergleiche Kapitel 1.3), einem Protein, das die subzelluläre Lokalisation von Plasmamembran-Proteinen steuert (Shenolikar & Weinman, 2001). Während von Yoo *et al.* gezeigt wird, daß die höhere ROMK-Oberflächenexpression auf einem vermehrten Transport von Kanälen vom ER zur Plasmamembran basiert, demonstrieren Yun und Koautoren, daß es durch Sgk1 zu einer verzögerten Entfernung von ROMK aus der Plasmamembran kommt.

Die Aktivität spannungsabhängiger Kaliumkanäle der Familien Kv1 und Kv4 wird ebenfalls durch Sgk1 moduliert. Diese zunächst an *Xenopus* Oocyten und transfizierten HEK293 Zellen beobachteten Effekte (Gamper *et al.*, 2002a; Henke *et al.*, 2004; Baltaev *et al.*, 2005) konnten später mit Hilfe von Fibroblasten aus Sgk1<sup>-/-</sup> Tieren bestätigt werden. Dort zeigte sich, daß zwar das Fehlen von Sgk1 die Funktion der Kanäle nicht generell beeinträchtigt, daß aber ihre Regulation durch Serum, Glukokortikoide oder IGF-1 gestört ist (Shumilina *et al.*, 2005).

Mit Hilfe von Experimenten an Oocyten wurde ein aktivierender Einfluß von Sgk1 auf den spannungsabhängigen Kaliumkanal KCNQ4 und auf die Kaliumkanaluntereinheit KCNE1, welche mit weiteren Proteinen einen langsam aktivierbaren Kanal bildet, gezeigt (Embark *et al.*, 2003; Seeböhm *et al.*, 2005). KCNQ4 wird im Gehirn und im Innenohr exprimiert und besitzt ein potentielles Sgk1 Phosphorylierungsmotiv. Ein Austausch von Serin gegen Alanin in diesem Motif verringert den Einfluß von Sgk1 auf die Aktivität des Kanals (Seeböhm *et al.*, 2005).

## 1.9 Ein Vielzahl weiterer Transporter und Kanäle wird durch Sgk1 reguliert

Tabelle 1.1 gibt eine Übersicht über alle Kanäle und Transporter, für die bisher eine Regulation durch Sgk1 beschrieben wurde. Der Mechanismus, mit dem Sgk1 die Funktion der Transportproteine steuert, ist nur in einigen Fällen untersucht worden. Für den Glukose-Transporter SGLT1, den intestinale Phosphat-Cotransporter NaPi IIb, die Glutamat-Transporter EAAT1 und EAAT2 und den Chloridkanal ClC-Ka/barttin wurde - in Analogie zu ENaC - eine Regulation über Nedd4-2 gezeigt. Oocyten-Experimente mit entsprechenden Deletionsvarianten zeigten, daß die direkte Phosphorylierung von Nedd4-2 durch Sgk1 zu einer erhöhten Aktivität der entsprechenden Plasmamembranproteine führt (Dieter *et al.*, 2004; Palmada *et al.*, 2004a; Böhmer *et al.*, 2003a; Böhmer *et al.*, 2006; Embark *et al.*, 2004a).

Für die Sgk1-vermittelte Regulation des epithelialen Natrium/Protonen-Tauschers NHE ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger) 3 wurde ein ähnlicher Mechanismus vorgeschlagen wie für ROMK1. Sgk1 soll mit seinem C-Terminus an die zweite PDZ-Domäne von NHERF2 binden, wodurch eine räumliche Nähe zu NHE3 vermittelt wird. Durch die Phosphorylierung von NHE3 schließlich wird der Transporter aktiviert (Yun *et al.* 2002b; Wang *et al.*, 2005). Eine Rolle für NHERF2 wurde auch für die Sgk1-abhängige Aktivierung des Calciumkanals TRPV5 gezeigt (Embark *et al.*, 2004b; Palmada *et al.*, 2005a).

Die Effekte von Sgk1 auf die verschiedenen Transporter wurden fast ausschließlich in *Xenopus* Oocyten untersucht. Mit Hilfe von Sgk1<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten sich im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistern bei der Analyse der Funktion von NHE3, SGLT1 und TRPV5 kaum Unterschiede, die im Falle von NHE3 und SGLT1 nur nach Applikation von Dexamethason nachweisbar waren (Sandulache *et al.*, 2006; Grahammer *et al.*, 2006a).

**Tabelle 1.1 Durch Sgk1 regulierte Transporter und Kanäle**

Name (Abkürzung)	Funktion	Referenz
SLC6A8	Kreatin Transporter	Shojaiefard <i>et al.</i> , 2005
4F2hc/LAT1	Aminosäuretransporter	Wagner <i>et al.</i> , 2000
ASCT2	Aminosäuretransporter	Palmada <i>et al.</i> , 2005b
SN1	Glutamin-Transporter	Böhmer <i>et al.</i> , 2003b
EAAT1, 2, 4, & 5	Glutamat-Transporter	Böhmer <i>et al.</i> , 2003a; Böhmer <i>et al.</i> , 2006; Böhmer <i>et al.</i> , 2004a; Böhmer <i>et al.</i> , 2005
SGLT1	Glukose-Transporter	Dieter <i>et al.</i> , 2004
GLUT1	Glukose-Transporter	Palmada <i>et al.</i> , 2006
NaPi IIb	Phosphat Cotransporter	Palmada <i>et al.</i> , 2004a
NaDC-1	Natriumdicarboxylat Transporter	Böhmer <i>et al.</i> , 2004
TRPV5	Calciumkanal	Embark <i>et al.</i> , 2004b
CIC-Ka/barttin	Chloridkanal	Embark <i>et al.</i> , 2004a
CIC-2	Chloridkanal	Palmada <i>et al.</i> , 2004b
CFTR	Chloridkanal	Wagner <i>et al.</i> , 2001
Kv1- und Kv4-Familie	Kaliumkanäle	siehe Kapitel 1.8
KCNE1	Kaliumkanal	siehe Kapitel 1.8
KCNQ4	Kaliumkanal	siehe Kapitel 1.8
ROMK1	Kaliumkanal	siehe Kapitel 1.8
VSOAC	Osmolyt- und Anionenkanal	Wang <i>et al.</i> , 2004
SCN5A	Kardialer Natriumkanal	Böhmer <i>et al.</i> , 2003c
ENaC	Epithelialer Natriumkanal	siehe Kapitel 1.6
GluR6	ionotroper Kainatrezeptor	Strutz-Seebohm <i>et al.</i> , 2005a
NHE3	Natrium/Protonen-Tauscher	Yun <i>et al.</i> , 2002b
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase	Natrium/Kalium-Tauscher	siehe Kapitel 1.7

## 1.10 Der Einfluß von Sgk1 auf Zellproliferation und Apoptose

Sgk1 steuert nicht nur Plasmamembranproteine, sondern hat auch einen Einfluß auf den Zellzyklus und wirkt antiapoptotisch. Erste Hinweise auf diese Funktion von Sgk1 lieferten Daten, die zeigten, daß die Progression des Zellzyklus durch die aktive Translokation von Sgk1 zwischen Zellkern und extranukleären Bereichen beeinflusst wird (Buse *et al.*, 1999, vergleiche Kapitel 1.5). Experimente mit der Mammaepithel-Zelllinie MCF10A deckten auf, daß Sgk1 ein wesentlicher Mediator der antiapoptotischen Wirkung von Glukokortikoiden ist. Unabhängig davon führt die Überexpression von Sgk1, nicht jedoch die einer Variante ohne Kinaseaktivität in MCF10A Zellen zu einer geringeren Apoptoserate (Mikosz *et al.*, 2001). Die Phosphorylierung des zur sogenannten *Forkhead*-Familie gehörenden Transkriptionsfaktors FOXO3a (FKHRL1) wird für die antiapoptotische Wirkung von Sgk1 verantwort-

lich gemacht (Brunet *et al.*, 2001). FOXO3a steuert die Expression einer Reihe von Genen, die für Zellzyklusarrest oder die Induktion von Apoptose verantwortlich sind. Werden Zellen mit Wachstumsfaktoren stimuliert, so wird FOXO3a mehrfach phosphoryliert und verläßt daraufhin den Zellkern, womit die FOXO3a-abhängige Transkription terminiert wird (Brunet *et al.*, 1999; Medema *et al.*, 2000; Dijkers *et al.*, 2000a; Dijkers *et al.*, 2000b; Nakamura *et al.*, 2000). Die Stimulus-abhängige Phosphorylierung von FOXO3a erfolgt in HEK293-Zellen sowohl durch Sgk1, als auch durch PKB/Akt, allerdings bevorzugen die beiden Kinasen verschiedene Serin- bzw. Threonin-Reste von FOXO3a (Brunet *et al.*, 2001). Die Phosphorylierung von FOXO3a durch Sgk1 ist also an die nukleäre Lokalisation der Kinase gebunden (vergleiche Kapitel 1.5). Leong *et al.* konnten mit Hilfe von Luciferase Reporter-Assays in NMuMg Mammaepithelzellen nach Zugabe von Glukokortikoiden nur eine geringfügig reduzierte FOXO3a-abhängige Transkription detektieren. Im Gegensatz dazu wird die Aktivität von FOXO3a nach hyperosmolarem Stress, Hitzeschock, UV-Bestrahlung und oxidativem Stress deutlich verringert. Ohne daß eine direkte Phosphorylierung von FOXO3a durch Sgk1 nachgewiesen wurde, beruht dieser Effekt nach Leong und Koautoren maßgeblich auf Sgk1, da PKB/Akt unter diesen Umständen nicht aktiviert wird (Leong *et al.*, 2003). Interessanterweise wird in dieser Arbeit zum Nachweis der antiapoptotischen Wirkung von Sgk1 u.a. eine putativ konstitutiv aktive T256D, S422D-Variante von Sgk1 verwendet, von der vorher gezeigt wurde, daß sie keine enzymatische Aktivität hat (Kobayashi & Cohen, 1999a).

You und Koautoren fanden 2004, daß das durch DNA-Schäden aktivierte Protein p53 zu einer Phosphorylierung von FOXO3a, und damit zu seiner Inaktivierung durch Translokation in das Cytosol führt. Dieser Mechanismus ist unabhängig von PKB/Akt und basiert auf der MAP-Kinase-abhängigen posttranslationalen Aktivierung von Sgk1 (You *et al.*, 2004).

In der Nematode *C. elegans* spielt das Sgk1-Homolog eine Rolle bei Signaltransduktionsprozessen und ist, entweder direkt oder indirekt, ebenfalls an der Phosphorylierung des FOXO3a-Homologs DAF-16 beteiligt. Interessanterweise bildet Sgk1 in *C. elegans* zusammen mit Akt1 und Akt2 einen multimeren Komplex, dessen Aktivität strikt von PDK1 abhängt. Bei Experimenten mit Nematoden, in denen die Sgk1-Expression ausgeschaltet worden war, zeigten sich Defekte bei der Eiablage, eine erhöhte Resistenz gegen oxidativen Stress sowie auf Hitze, und – als bemerkenswerteste Beobachtung – eine verlängerte Lebensspanne (Hertweck *et al.*, 2004).

Ein weiterer Mechanismus der antiapoptotischen Wirkung von Sgk1 wird möglicherweise durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B (*nuclear factor*  $\kappa$ B) realisiert. Zhang und Koautoren wiesen in Zellkulturexperimenten nach, daß Sgk1 eine beschleunigte Degradation des NF $\kappa$ B-Inhibitors I $\kappa$ B infolge einer Phosphorylierung durch die Kinase IKK $\beta$  (I $\kappa$ B Kinase  $\beta$ ) bewirkt und schlagen als Mechanismus eine direkte Phosphorylierung von IKK $\beta$  durch Sgk1 vor. Überexpression oder Aktivierung von Sgk1 führt so zu einer gesteigerten transkriptionellen Aktivität von NF $\kappa$ B und damit u.a. zu einer antiapoptotischen Wirkung (Zhang *et al.*, 2005).

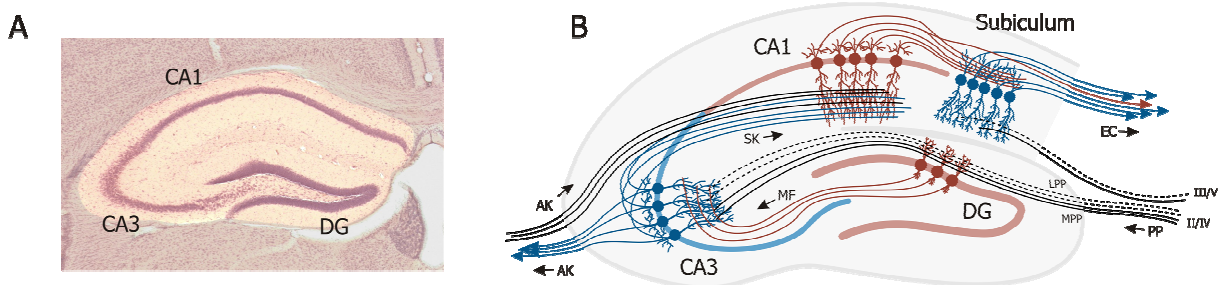


## 1.11 Sgk1 im Nagetiergehirn

Sgk1 wird in verschiedenen Teilen des ZNS exprimiert (Waldegger *et al.*, 1997; Wärtges *et al.*, 2002a) und einige Publikationen und unveröffentlichte Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe Kuhl deuten auf eine Funktion von Sgk1 bei Lernvorgängen und der Gedächtnisbildung im Nagetiergehirn hin.

Eine herausragende Rolle für das bewußte, sogenannte explizite oder deklarative Lernen und die Assoziation verschiedener Reize miteinander spielt der subkortikal gelegene Hippocampus. Neben dem Lernen über Fakten, Orte, Personen und Ereignisse ist die anatomisch hochgeordnete hippocampale Formation insbesondere für das Übertragen von Lerninhalten aus dem Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis verantwortlich, sowie möglicherweise für die Reaktivierung von Gedächtnisinhalten (Squire *et al.*, 1993; Eichenbaum, 2001; Debiec *et al.*, 2002; Nader, 2003). Wird der Hippocampus bilateral entfernt, gehen diese Fähigkeiten auch beim Menschen vollständig verloren (Scoville & Milner, 1957; Penfield & Milner, 1958; Milner *et al.*, 1968).

Durch seinen klaren anatomischen Aufbau und seine Bedeutung für Lernen und Gedächtnis ist der Hippocampus eine der am besten untersuchten Regionen des Säugergehirns. Anatomie, die Verschaltung der Neurone und der Informationsfluß in dem sogenannten trisynaptischen Schaltkreis des Hippocampus sind ausführlich in Abbildung 1.6 dargestellt und in der Legende zu der Abbildung beschrieben.



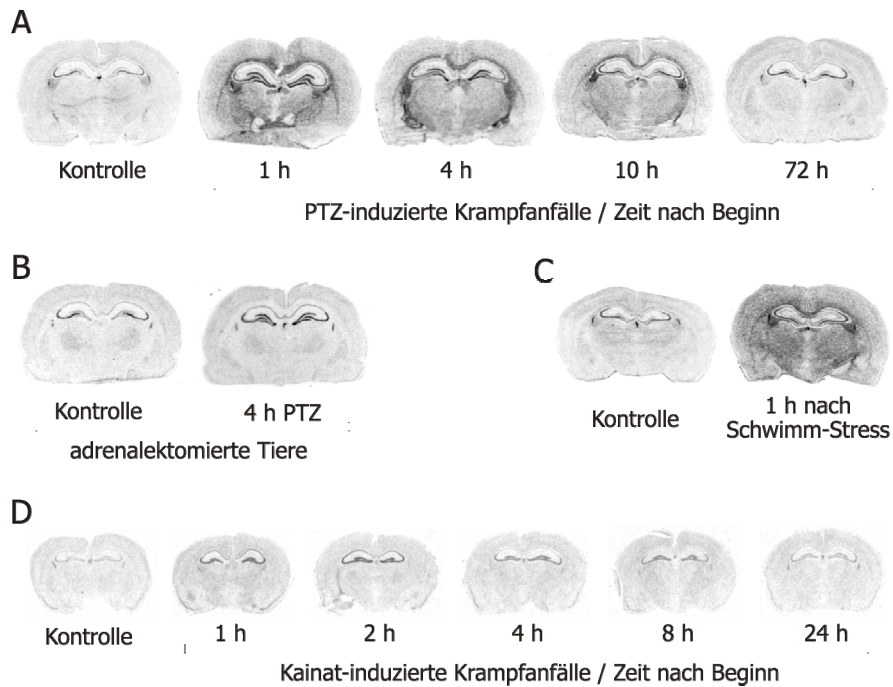
**Abbildung 1.6 Aufbau und Verschaltung des Hippocampus.**

Als Hippocampus werden heute im allgemeinen der Gyrus dentatus (DG), das Ammonshorn oder Cornu ammonis mit den Regionen CA1-3, sowie das Subiculum zusammengefasst. **A.** zeigt einen mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten coronaren Schnitt durch den Hippocampus, der zur besseren Abgrenzung gegen das restliche Gehirngewebe optisch etwas aufgehellt wurde. In **B.** sind schematisch die neuronale Verschaltung innerhalb des Hippocampus sowie die wichtigsten Faserverbindungen zu anderen Teilen des Gehirns dargestellt. Afferenzen erhält der Hippocampus zunächst über den Tractus perforans (perforanter Pfad, PP) aus dem entorhinalen Cortex (EC). Dabei enden die Axone der kortikalen Schichten III und V hauptsächlich im Subiculum, während die Fasern aus den Schichten II und IV auf die Neurone des Gyrus dentatus und die CA3-Region projizieren. MPP: medialer perforanter Pfad, LPP: lateraler perforanter Pfad. Das größte efferente System des Gyrus dentatus sind die Moosfasern (MF), die in der Radialschicht der CA3-Region enden, um Synapsen mit den dortigen CA3-Pyramidenzellen zu bilden. Die Axone der CA3-Neurone verlassen den Hippocampus über die assoziative Kommissur oder führen als sogenannte Schaffer-Kolaterale (SK) zu den Pyramidenzellen der CA1-Region. Von hier aus erreichen die Efferenzen des trisynaptischen Schaltkreises entweder direkt oder nach Umschaltung im Subiculum wieder den entorhinalen Cortex.

Bereits im Jahre 1949 stellte der kanadische Psychologe Donald Hebb eine Theorie zur Gedächtnisbildung in einem netzwerkartig organisierten Neuronenverband auf. Dabei formulierte er die These, daß Zellen, die koinzident aktiv sind, ihre synaptischen Verbindungen verstärken (Hebb, 1949). Diese sogenannte Hebb'sche Regel wurde später durch elektrophysiologische Experimente von Bliss und Lomo bestätigt. Nach hochfrequenter elektrischer Stimulation des Tractus perforans (vergleiche Abbildung 1.6) zeigte sich eine über Stunden und teilweise sogar Tage anhaltende Effizienzsteigerung der excitatorischen Signalübertragung auf die nachgeschalteten Neurone des Gyrus dentatus (Bliss & Lomo, 1973). Dieses als Langzeitpotenzierung (*long term potentiation*, LTP) bezeichnete Phänomen läßt sich in vielen neuronalen Verbänden nachweisen und gilt als etabliertes zelluläres Modell für Lernprozesse des ZNS (Bliss & Collingridge, 1993). Erst kürzlich konnte an lebenden Tieren gezeigt werden, daß Lernprozesse tatsächlich zu LTP im Hippocampus führen (Whitlock *et al.*, 2006).

Messbare Veränderungen in der Signalübertragung zwischen Neuronen beruhen auf Veränderungen der Konnektivität zwischen zwei oder mehr Nervenzellen und damit auf direkten Veränderungen an der Synapse. Die molekularen Grundlagen, die dieser synaptischen Plastizität zu Grunde liegen, sind bereits teilweise verstanden und haben nicht nur funktionelle, sondern auch morphologische Korrelate. Die frühe LTP-Phase, die etwa drei Stunden stabil ist und noch nicht zu beobachtbaren morphologischen Veränderungen an der Synapse führt, beruht ausschließlich auf posttranslationalen Proteinmodifikationen. So wird z.B. die Leitfähigkeit von Ionenkanälen durch Phosphorylierung moduliert (Soderling & Derkach, 2000; Lisman *et al.*, 2002). Späte LTP, die über Tage stabil bleiben kann und zu strukturellen Veränderungen an der Synapse führt, beruht dagegen auf *de novo* Genexpression und Proteinbiosynthese (Flexner *et al.*, 1963; Frey *et al.*, 1996; Krug *et al.*, 1984; Frey *et al.*, 1988; Goelet *et al.*, 1986; Nguyen & Kandel, 1996; Engert & Bonhoeffer, 1999; Toni *et al.*, 1999). Dieses Erkenntnis führte zur Identifikation von aktivitätsregulierten Genen, die als unmittelbar-früh exprimierte Gene sofort nach neuronaler Aktivität verstärkt transkribiert werden und entweder direkte Effektorfunktionen in der Nervenzelle haben, oder die Expression weiterer Gene steuern (Morgan *et al.*, 1987; Saffen *et al.*, 1988; Yamagata *et al.*, 1994; Yamagata *et al.*, 1993; Tsui *et al.*, 1996; Brakemann *et al.*, 1997; Link *et al.*, 1995; Qian *et al.*, 1993; Kauselmann *et al.*, 1999; Plath *et al.*, 2006).

Überschiessende neuronale Aktivität läßt sich experimentell durch das Auslösen generalisierter Krampfanfälle erzeugen. Nach der pharmakologischen Induktion von Krampfanfällen in Ratten wurde Sgk1 erstmals in der Arbeitsgruppe Kuhl als aktivitätsreguliertes Gen im Hippocampus beschrieben (Kauselmann, 1997). Dabei zeigte sich eine konstitutive Expression von Sgk1 mRNA in der CA3-Region und eine stark aktivitätsabhängige Expression in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus (siehe Abbildung 1.7). Darüberhinaus konnte eine diffuse Expression in Oligodendrocyten des gesamten Gehirns kurz nach einem Krampfanfall beobachtet werden. Im Gegensatz zur mRNA-Induktion im Gyrus dentatus basiert die oligodendrocytäre Komponente der Sgk1 Expression auf der Ausschüttung von Stresshormonen aus der Nebenniere, da sie in adrenaletomierten Ratten fehlt. Umgekehrt konnte in Tieren, die zuvor einem Stressreiz ausgesetzt waren, eine vermehrte Sgk1-Transkription ausschließlich in Oligodendrocyten, nicht jedoch im Gyrus dentatus nachgewiesen werden (vergleiche Abbildung 1.7). Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, daß die Sgk1 mRNA-Expression im Gyrus dentatus ausschließlich auf neuronaler Aktivität beruht. Das Expressionmuster von Sgk1 mRNA



**Abbildung 1.7 Sgk1 mRNA wird nach Krampfanfällen und Stress im Nagetiergehirn exprimiert.**

Die Abbildung zeigt eine Zusammenstellung von *in situ*-Hybridisierungen mit einer Sgk1-spezifischen Sonde in Ratten- (A-C) und Mäusegehirnen (D). A zeigt die räumlich-zeitliche Analyse der Sgk1 mRNA-Expression vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Pentylentetrazol-induzierten Krampfanfällen bei Ratten. Sgk1 wird konstitutiv in der CA3-Region (vergleiche Abbildung 3.6) exprimiert. Nach einem Anfall kommt es zu einer deutlichen Induktion von Sgk1 mRNA in den Körnerzellen des Gyrus dentatus sowie in Oligodendrozyten im gesamten Gehirn. In Ratten, denen die Nebenniere entfernt wurde (B), sind 4 h nach einem Krampfanfall deutlich weniger Transkripte in Gliazellen nachweisbar, die Induktion im Gyrus dentatus bleibt jedoch erhalten. Im Gegensatz dazu wird eine Stunde, nachdem Ratten Stress durch Schwimmen ausgesetzt waren, wird Sgk1 mRNA in Oligodendrozyten, nicht jedoch in Neuronen hochreguliert (C). D zeigt die zeitabhängige Sgk1 mRNA-Expression im Gehirne von Mäusen nach der pharmakologischen Induktion von Krampfanfällen mit dem Glutamatrezeptor-Agonisten Kainat. Die Autoradiogramme der Abbildungen A-C entstammen der Dissertation von Gunther Kauselmann (1997), die Autoradiogramme aus D entstammen der Diplomarbeit von Florian Kirchner (2006).

nach der pharmakologischen Induktion generalisierter Krampfanfälle konnte später in Mäusehirnen bestätigt werden (Kirchner, 2006). Hier ist die oligodendrocytäre Komponente jedoch nicht so ausgeprägt wie in Ratten (siehe Abbildung 1.7).

Sgk1 wurde in zwei unabhängigen Arbeiten, in denen nach Genen, die eine Rolle bei der Konsolidierung und Rekonsolidierung von Gedächtnisinhalten nach kontextabhängiger Furchtkonditionierung von Mäusen spielen, identifiziert. In beiden Studien zeigte sich, daß Sgk1 mRNA im Hippocampus bei dieser Form des Lernens hochreguliert wird, bei der ein elektrischer Fußschock mit einem Ton und einer bestimmten Umgebung assoziiert wird. Ob Sgk1 dabei tatsächlich für die Konsolidierung bzw. Rekonsolidierung von Gedächtnisinhalten verantwortlich ist, oder allein durch eine gesteigerte neuronale Aktivität im Hippocampus induziert wird, blieb dabei jedoch unklar (Levenson *et al.*, 2004; von Herten & Giese, 2005).

Weitere Hinweise auf eine Beteiligung von Sgk1 an der *in vivo*-Gedächtniskonsolidierung stammen von Experimenten mit Ratten, die in einem Verhaltensexperiment zu Hippocampus-abhängigem räum-

lichen Lernen getestet wurden (Tsai *et al.*, 2002). Nach der Durchführung der Tests in dem sogenannten *Morris water maze* (Morris, 1984), bei dem die Tiere in einem Becken mit trübem Wasser eine verborgene Plattform mit Hilfe von räumlichen Orientierungshinweisen finden sollen, wurden zwei Gruppen gebildet: (1) langsam lernende und (2) schnell lernende Ratten. Northern Blot-Analysen und *in situ*-Hybridisierungen zeigten, daß in der Gruppe der schnell lernenden Ratten etwa die vierfache Menge Sgk1-mRNA im Gyrus dentatus sowie in den Regionen CA1 und CA3 des Hippocampus exprimiert wird. Darüberhinaus führte ein stereotaktisch durchgeführter Sgk1-Gentransfer in die CA1-Region zu verbesserten Lern-Ergebnissen im *Morris water maze*, wohingegen der Gentransfer von inaktiver Sgk1 die Ergebnisse verschlechterte.

Eine im Vergleich zu Kontrolltieren erhöhte hippocampale Sgk1 mRNA- und Proteinexpression wurde bei Ratten gefunden, die über einen Zeitraum von zwei Wochen jeweils eine Stunde täglich in einer für sie stimulierenden Umgebung verbrachten (Lee *et al.*, 2003). In der gleichen Arbeit wurden Hinweise darauf geliefert, daß diese erhöhte Sgk1-Expression für bessere Leistungen bei anschließend durchgeführten Lerntests wie Furchkonditionierung, Objekterkennung oder bei Experimenten im *Morris water maze* verantwortlich ist. Sowohl die erhöhte Sgk1-Expression, als auch der positive Einfluß auf die Lerntests werden durch Blockade von Glutamat-Rezeptoren vom  $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methylisoxazol-4-Propionsäure-(AMPA-)Typ verhindert, wohingegen AMPA-Rezeptoragonisten die Sgk1-Expression im Hippocampus erhöhen (Lee *et al.*, 2003). Für die Aktivierung von Sgk1 durch Phosphorylierung an S78 im Hippocampus sollen MAP Kinasen eine Rolle spielen. Darüberhinaus ist die Phosphorylierung von T256 und S422 eine Voraussetzung für eine Beteiligung von Sgk1 an der Gedächtnisbildung (Lee *et al.*, 2006)

Über die eigentliche Funktion von Sgk1 im Hippocampus ist praktisch nichts bekannt. In einer Arbeit wird ein positiver Effekt von Sgk1 auf die Expression des Glutamatrezeptors GluR6 beschrieben (Strutz-Seebohm *et al.*, 2005a). David und Koautoren berichten, daß die erhöhte Expression von Sgk1 im Rückenmark zu vermehrtem Wachstum von dendritischen Fortsätzen führt, ohne jedoch einen molekularen Mechanismus für dieses Phänomen identifiziert zu haben (David *et al.*, 2005).

Das Mikrotubulus-assoziierte Protein Tau wird hauptsächlich in Neuronen exprimiert und trägt durch die Stabilisierung von Mikrotubuli zur Kontrolle zahlreicher zellulärer Prozesse wie Differenzierung oder Morphogenese bei. Tau wird an zahlreichen Aminosäureresten durch verschiedene Kinasen phosphoryliert, wodurch die Bindungsaffinität zu den Mikrotubuli abnimmt (Johnson & Stoothoff, 2004). Eine übermäßige Phosphorylierung von Tau führt zur Ausbildung von  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen, die fibrillären Aggregate bilden und eine Rolle bei der Pathogenese der Alzheimer'schen Erkrankung spielen (Kosik & Shimura, 2005). *In vitro*-Phosphorylierungsexperimente mit rekombinanter Sgk1 und humanem Tau zeigen, daß Tau an Serin 214 möglicherweise auch durch Sgk1 phosphoryliert wird (Chun *et al.*, 2004). Die Autoren dieser Arbeit postulieren dabei für die Phosphorylierungsreaktion einen Mechanismus, der von der Wirkung von 14-3-3 Proteinen abhängig ist. Kürzlich konnte die Phosphorylierung von Tau durch Sgk1 an Serin 214 in HEK293 Zellen sowie in kultivierten hippocampalen Neuronen bestätigt werden. Dabei zeigte sich, daß sowohl die Modifikation von Tau, als auch ein direkter Einfluß von Sgk1 auf die Mikrotubuli zur Mikrotubulus-Depolymerisation und damit zu ei-

ner vermehrten Neuritenbildung führt (Yang *et al.*, 2006). Interessanterweise ist die Kinase-Aktivität von Sgk1 für die direkt destabilisierende Wirkung auf die Mikrotubuli entbehrlich. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen könnten gleichzeitig die mechanistische Erklärung für die im Rückenmark von Ratten beobachtete Sgk1-induzierte Neuritenbildung sein (David *et al.*, 2005; siehe oben).

## 1.12 Sgk1 spielt eine pathophysiologische Rolle bei einigen Erkrankungen

Vor dem Hintergrund, daß Sgk1 einen aktivierenden Einfluß auf Ionenkanäle hat, welche eine wichtige Funktion in der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts haben (vergleiche Kapitel 1.6 - 1.9), wurden genetische Studien zur Assoziation von arterieller Hypertonie und Polymorphismen im Sgk1-Gen durchgeführt. Dabei wurden in Intron 6 und Exon 8 des Sgk1-Gens je ein Polymorphismus entdeckt, der einen Einfluß auf den systolischen und diastolischen Blutdruck hat (Busjahn *et al.*, 2002; Busjahn & Luft, 2003; Trochen *et al.*, 2004). Interessanterweise wurde bei Individuen mit tendenziell höheren Blutdruck, die den Polymorphismus CC/CT in Exon 8 und CC in Intron 6 tragen, auch eine Verkürzung des QT-Intervalls im Elektrokardiogramm gefunden. Dieser Effekt soll auf dem Einfluß von Sgk1 auf die Kaliumkanäle KCNE1/KCNQ1 basieren (Busjahn *et al.*, 2003). Neben den genetischen Assoziationsstudien führten Untersuchungen mit verschiedenen Rattenstämmen zu dem Schluß, daß Sgk1 eine wichtige Rolle bei der renalen Salzadaptation und Blutdruckregulation spielt (Farjah *et al.*, 2003).

Ullrich und Koautoren zeigten durch Untersuchungen von Langerhans-Inselzellen aus dem Pankreas von Wildtyp- und Sgk1<sup>-/-</sup> Mäusen, daß Sgk1 ein entscheidender Signaltransduktor bei der Entstehung des Glukokortikoid-induzierten Diabetes Mellitus ist (Ullrich *et al.*, 2005).

Darüberhinaus wurde Sgk1 mit der Entstehung diabetischer Folgeschäden an der Niere in Verbindungen gebracht, da hier sowohl beim Menschen als auch im Mausmodell eine erhöhte Expression von Sgk1 mRNA nachgewiesen werden konnte (Kumar *et al.*, 1999). Erhöhte Sgk1-Expression in Koinkidenz mit Hyperglykämie führt zur vermehrten Deposition von Matrixproteinen und trägt wahrscheinlich zur Entstehung der diabetischen Nephropathie bei (Feng *et al.*, 2005). Eine ähnliche Rolle spielt Sgk1 möglicherweise bei der Fibrosierung der Lunge und des Herzens (Wärntges *et al.*, 2002b; Vallon *et al.*, 2006). Sgk1 soll außerdem an der Inhibition der durch biomechanischen Stress ausgelösten Apoptose in Cardiomyocyten genauso beteiligt sein, wie an den Prozessen des pulmonalen Gefäßumbaus bei pulmonalarterieller Hypertonie (Aoyama *et al.*, 2005; BelAiba *et al.*, 2006). Auch in Verbindung mit Glomerulonephritis und chronische viraler Hepatitis wurde von einer erhöhten Sgk1 mRNA-Expression berichtet, ohne daß jedoch ein kausaler Zusammenhang zur Pathogenese untersucht wurde (Friedrich *et al.*, 2002; Fillon *et al.*, 2002). Eine vermehrte Expression von Sgk1 in Lungengewebe von Patienten mit Cystischer Fibrose soll eine der Ursachen für die erhöhte Aktivität von Natriumkanälen bei diesen Patienten sein (Wagner *et al.*, 2001).

Es gibt Befunde, daß der Verlauf zweier neurodegenerativer Erkrankungen, der Chorea Huntington und des Morbus Parkinson, durch Sgk1 beeinflusst wird. Mit Hilfe von *in vitro*-Phosphorylierungen und

Koexpressionsstudien in HEK293-Zellen konnte gezeigt werden, daß das Protein Huntingtin nicht nur von PKB/Akt, sondern auch von Sgk1 an Serin 421 phosphoryliert werden kann (Humbert *et al.*, 2002; Rangone *et al.*, 2004). Huntingtin weist bei Patienten mit Chorea Huntington eine abnorm große Anzahl von aufeinanderfolgenden Glutaminresten auf (polyQ), die für die Pathogenese der Erkrankung entscheidend sind. Sowohl die Phosphorylierung von S421 durch PKB/Akt, als auch durch Sgk1 führt zu einer Verringerung der Neurotoxizität der polyQ Huntingtin-Variante. Darüberhinaus findet sich eine erhöhte, möglicherweise reaktive Expression von Sgk1 in Gehirnen von Huntington-Patienten (Humbert *et al.*, 2002; Rangone *et al.*, 2004).

In einem Tiermodell für den Morbus Parkinson, bei dem die Erkrankung durch Injektion der Substanz 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP) in Mäusen ausgelöst wird, zeigte sich ein starker Anstieg der Sgk1 Transkription. Dieser war überraschenderweise nicht auf die Substantia nigra beschränkt, sondern konnte im ganzen Gehirn nachgewiesen werden (Stichel *et al.*, 2005). Bei der gleichzeitigen Administration von MPTP und Acetylsalicylsäure, die beim Morbus Parkinson eine protektive Wirkung hat, zeigte sich keine erhöhte Sgk1-Expression (Schoenebeck *et al.*, 2005).

### 1.13 Weitere Funktionen und Phosphorylierungstargets von Sgk1

Neben den oben ausführlicher beschriebenen Funktionen von Sgk1 wurden in einzelnen Publikationen weitere Sgk1-Phosphorylierungstargets identifiziert und damit regulatorische Funktionen für Sgk1 impliziert.

Ausgehend von der Tatsache, daß Sgk1 eine hohe Homologie zu PKB/Akt aufweist und die gleiche Substratspezifität besitzt, beschreiben zwei Arbeiten einen negativ-regulatorischen, zur Wirkung von PKB/Akt analogen Einfluß von Sgk1 auf das MAP-Kinase Signaltransduktionssystem. Mit Hilfe von *in vitro*-Phosphorylierung von Peptiden und Transfektionsstudien wurde gezeigt, daß Sgk1 die MAP-Kinase Kinase Kinase 3 (MEKK3) an zwei Serinresten und die Kinase B-Raf an einem Serinrest phosphoryliert (Zhang *et al.*, 2001; Chun *et al.*, 2003). Sowohl Raf- als auch MEKK-Proteine transduzieren über Ras-GTP weitergeleitete Proliferationssignale von der Zelloberfläche auf nachgeschaltete MAP-Kinasen, die dann z.B. einen starken Einfluß auf die Genexpression der Zelle nehmen (Widmann *et al.*, 1999).

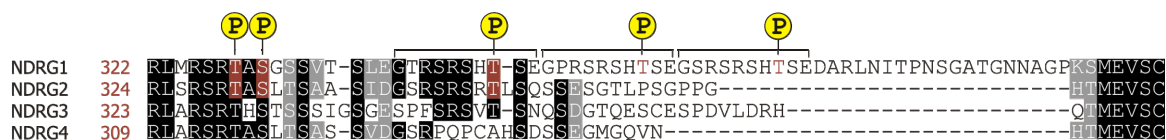
Einem ähnlichen Ansatz folgend, wurde der nukleär lokalisierte Transkriptionsfaktor *cAMP responsive element binding protein* (CREB) als Substrat von Sgk1 identifiziert (David & Kalb, 2005). Genau wie PKB/Akt, PKA, RSK und die Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase (CaMK) phosphoryliert Sgk1 CREB an S133, was unmittelbar zu Aktivierung des Transkriptionsfaktors führt. Auf CREB konvergieren damit zahlreiche Signaltransduktionswege, die in praktisch allen Geweben eine Rolle spielen (Shaywitz & Greenberg, 1999; Du & Montminy, 1998).

Auch die Glykogen Synthase Kinase (GSK) 3 $\beta$  scheint ein gemeinsames Ziel von PKB/Akt und Sgk1 zu sein. Durch eine Phosphorylierung an S9 wird die Kinase, die neben dem Glykogen-Metabolismus zahlreiche weitere zelluläre Prozesse steuert, inaktiviert (Cross *et al.*, 1995; Kobayashi & Cohen, 1999a; Sakoda *et al.*, 2003; Wyatt *et al.*, 2006).



Bei der Suche nach Interaktionspartnern von Sgk1 mit Hilfe des Hefe Zwei-Hybrid-Systems wurde die Phosphomannomutase 2 (PMM2) als Substrat von Sgk1 identifiziert. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen und Koimmunpräzipitationsexperimente zeigen eine Kollokalisierung beider Enzyme im Cytosol von COS7-Zellen. Die Phosphorylierung durch Sgk1 soll zu einer verminderten enzymatischen Aktivität von PMM2 führen (Menniti *et al.*, 2005). PMM2 katalysiert einen Schritt bei der Synthese von Glykosylphosphatidylinositol Membran-Ankern, sowie bei der Synthese von Dolicholpyrophosphat-Oligosacchariden, die bei der *N*-Glykosylierung von Proteinen im ER auf naszierende Polypeptidketten übertragen werden (Van Schaftingen & Jaeken, 1995).

Die einzigen Substrate, deren Phosphorylierung durch Sgk1 unter Zuhilfenahme von Sgk1<sup>-/-</sup> Mäusen nachgewiesen werden konnten, sind die Proteine *N-myc downstream regulated gene* (NDRG) 1 und NDRG2. Durch Phospho-spezifische Antikörper konnte gezeigt werden, daß NDRG1 nur in Wildtyp-Mäusen, nicht jedoch in Sgk1<sup>-/-</sup> Tieren an den Resten T346, T356 und T366 im Bereich einer sich dreifach wiederholenden Dekapeptid-Sequenz am C-Terminus des Proteins phosphoryliert wird. Diese Dekapeptid-Wiederholung findet sich nur in NDRG1, nicht jedoch in den Homologen NDRG2-4 (siehe Abbildung 1.8). Mit der gleichen Methode wurde nachgewiesen, daß die Reste T330, S332 und T348 in NDRG2 von Sgk1 phosphoryliert werden. Sehr wahrscheinlich werden auch die Reste T328 und S330 in NDRG1 durch Sgk1 phosphoryliert. Durch diese Experimente wurde nicht nur eindeutig gezeigt, daß die Proteine der NDRG-Familie physiologische Substrate von Sgk1 sind, sondern auch, daß die untersuchten Reste ausschließlich durch Sgk1 phosphoryliert werden. Interessanterweise wird NDRG1 durch die Sgk1-katalysierten Modifikationen am C-Terminus zusätzlich zu einem Substrat für GSK3 (Murray *et al.*, 2004).



#### Abbildung 1.8 Sgk1-Phosphorylierungsstellen der NDRG-Proteinfamilie.

Es sind die C-Termini der murinen NDRG-Isoformen dargestellt. NDRG1 unterscheidet sich von NDRG2-4 durch die dreifache Kopie eines fast identischen Dekapeptids. Die Sequenzwiederholungen sind durch Klammern über der Sequenz gekennzeichnet. Die von Murray und Koautoren (2004) nachgewiesenen Sgk1-Phosphorylierungsstellen sind braun dargestellt. Interessanterweise gehören T328 in NDRG1 und T330 in NDRG2 nicht zu dem klassischen Sgk1 Erkennungsmotif RxRxxS/T.

Autosomal-rezessive Mutationen des NDRG1-Gens verursachen die nach der Bulgarischen Stadt Lom benannte Variante der hereditären sensomotorischen Neuropathie (HMSN-Lom), die auch als Charcot-Marie-Tooth Erkrankung Typ 4D klassifiziert wird (Kalaydjieva *et al.*, 1996; Kalaydjieva *et al.*, 2000). Einen dieser demyelinisierenden Erkrankung ähnlichen Phänotyp zeigen NDRG1<sup>-/-</sup> Mäuse. Die Tiere entwickeln ab einem Alter von zwei Wochen einen progredienten Myelinisierungsdefekt periphe-



rer Nerven, der auf die fehlende Expression von NDRG1 in Schwann-Zellen zurückzuführen ist (Okuda *et al.*, 2004; Berger *et al.*, 2004).

Relativ wenig ist über die NDRG-Proteine auf molekularer Ebene bekannt. Die Expression des zyttoplasmatisch lokalisierten NDRG1 wird während zellulärer Differenzierung induziert und durch Transkriptionsfaktoren der myc-Familie unterdrückt (Lachat *et al.*, 2002; van Belzen *et al.*, 1997; Shimono *et al.*, 1999). NDRG1 wird außerdem durch p53 hochreguliert und soll eine Rolle beim Auslösen p53-medierter Apoptose spielen (Kurdistani *et al.*, 1998; Stein *et al.*, 2004). NDRG2 wird sowohl in einer Nierenzelllinie, als auch im Colon und der Niere der Ratte durch Aldosteron, nicht jedoch durch Glukokortikoide induziert (Boulkroun *et al.*, 2002). NDRG1-3 lassen sich in sehr unterschiedlichen Mengen in fast allen Geweben nachweisen, während NDRG4 nur im Gehirn und im Herzen exprimiert wird (Zhou *et al.*, 2001).

## 1.14 Die Sgk-Familie umfaßt drei Isoformen

Mit Sgk2 und Sgk3/CISK (*cytokine-independent survival kinase*) existieren in allen höheren Säugern zwei weitere Isoformen zu Sgk1. Während Sgk3 in allen untersuchten Geweben nachweisbar ist, wird Sgk2 hauptsächlich in Leber, Niere und Pankreas, und in geringen Mengen im Gehirn exprimiert. Die Expression beider Isoformen, die wie Sgk1 durch PDK1 aktiviert werden, wird im Gegensatz zu Sgk1 nicht durch Serum oder Glukokortikoide stimuliert (Kobayashi *et al.*, 1999b; Dai *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000). Die drei Kinasen phosphorylieren die gleiche Konsensussequenz und zeigen eine Homologie von etwa 80 % in der Kinasedomäne und von 44-68 % im Bereich des C-Terminus (vergleiche auch Abbildung 1.1). Sgk3 besitzt einen vergleichsweise großen N-Terminus mit einer Phox Homologie (PX)-Domäne, über die die Kinase mit Inositolphosphaten interagiert. Über diese Interaktion bindet Sgk3 in Gegenwart von Signalen, die zur Generierung entsprechend phosphorylierter Lipide führen, an die Außenseite von endosomalen Vesikeln (Xu *et al.*, 2001; Virbasius *et al.*, 2001; Xing *et al.*, 2004; Tessier & Woodgett, 2006). Deletion der PX-Domäne führt zu einer cytoplasmatischen Lokalisation und verminderter Aktivität der Kinase.

Untersuchungen zur Funktion von Sgk2 beschränken sich auf heterologe Koexpressionsstudien wie sie auch für Sgk1 zur Analyse des Einflusses auf verschiedene Membranproteine durchgeführt wurden (vergleiche Kapitel 1.6-1.9). Dabei zeigte sich, daß Sgk2 möglicherweise einen Einfluß auf die Funktion einiger der Transportproteine hat, die auch von Sgk1 gesteuert werden, wie z.B. die Kaliumkanäle KCNE1 (Embark *et al.*, 2003) und Kv1.3 (Gamper *et al.*, 2002b), den Chloridkanal CIC2 (Palmada *et al.*, 2004b), den Glutamattransporter EEAT4 (Böhmer *et al.*, 2004b), den Glutamatrezeptor GluR6 (Strutz-Seebohm *et al.*, 2005a), die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (Henke *et al.*, 2002) und ENaC (Friedrich *et al.*, 2003).

Sgk3 ist wesentlich besser charakterisiert als Sgk2 und wurde als antiapoptotisches Protein in einem Interleukin-3-abhängigen Zellsystem identifiziert. Dabei konnte gezeigt werden, daß Sgk3 die beiden proapoptotischen Proteine Bad und FOXO3a (vergleiche auch Kapitel 1.10) phosphoryliert und damit inaktiviert (Liu *et al.*, 2000). Sgk3<sup>-/-</sup> Mäuse sind vital, fertil und zeigen im Gegensatz zu Sgk1<sup>-/-</sup> Mäu-

sen keine beeinträchtigte renale Natriumausscheidung. Ein augenscheinlicher Phänotyp der Tiere besteht in einer abnormalen Fellstruktur, die auf einen histologisch nachweisbaren Defekt bei der Haarfollikelmorphogenese zurückzuführen ist. Dem liegen wahrscheinlich ein Proliferationsdefekt, geringfügig erhöhte Apoptoseraten und die nukleäre Akkumulation von  $\beta$ -Catenin in Haarfollikel-Keratinocyten zugrunde. Darüberhinaus wurde in kultivierten Keratinocyten von Sgk3<sup>-/-</sup> Tieren eine verlängerte Aktivierung des durch IGF-1 stimulierten MAP-Kinase Signaltransduktionsweges beobachtet, was möglicherweise für einen hemmenden Einfluß von Sgk3 auf diese Signalkaskade spricht (McCormick *et al.*, 2004; Alonso *et al.*, 2005). In Verhaltensexperimenten zeigten sich bei Sgk3<sup>-/-</sup> Mäusen ein vermindertes exploratives Verhalten, sowie eine geringfügig schlechtere räumliche Orientierung im *Morris water maze* (vergleiche Kapitel 1.11). Diese Befunde sind möglicherweise auf die Expression von Sgk3 im Hippocampus zurückzuführen (Lang *et al.*, 2005; Strutz-Seebohm *et al.*, 2005a).

Sgk3<sup>-/-</sup> Mäuse, die mit Sgk1<sup>-/-</sup> Mäusen verpaart wurden, zeigen einen Phänotyp, der einer Kombination beider Einzelphänotypen entspricht. Weitere Defekte wurden nicht beobachtet, was gegen die Annahme spricht, das die beiden Isotypen redundante Funktionen haben und der Verlust der einen Isoform durch die andere ersetzt werden kann (Grahammer *et al.*, 2006b).

An den Endosomen inhibiert Sgk3 die Agonisten-abhängige Degradation des endozytierten Chemokinrezeptors CXCR4. Dieser Effekt wird wahrscheinlich durch eine Interaktion von Sgk3 mit der E3 Ubiquitinligase AIP4, die die Degradation von CXCR4 steuert, vermittelt (Slagsvold *et al.*, 2006). Dieser Mechanismus ähnelt damit dem der Sgk1-gesteuerten Nedd4-2-abhängigen Endozytose von Untereinheiten des ENaC Kanals (vergleiche Kapitel 1.6).

Genau wie Sgk2 wurde auch Sgk3 in Verbindung mit der Regulation zahlreicher Transporter und Ionenkanäle gebracht. Dazu gehören Kaliumkanäle (Gamper *et al.*, 2002b, Henke *et al.*, 2002, Embark *et al.*, 2003), die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (Henke *et al.*, 2002), die Natriumkanäle ENaC und SCN5A (Friedrich *et al.*, 2003; Böhmer *et al.*, 2003c), der Chlorid-Kanal ClCa/barttin (Embark *et al.*, 2004a), der epitheliale Calcium-Kanal TRPV5 (Embark *et al.*, 2004b), verschiedene Metabolitransporter (Böhmer *et al.*, 2003a; Böhmer *et al.*, 2004b; Palmada *et al.*, 2004a; Palmada *et al.*, 2005b) und die Glutamatrezeptoren GluR1 und GluR6 (Strutz-Seebohm *et al.*, 2005a; Strutz-Seebohm *et al.*, 2005b; Strutz-Seebohm *et al.*, 2006).

## 1.15 Ziele dieser Arbeit

Die Serin/Threoninkinase Sgk1 wurde in der Arbeitsgruppe Kuhl erstmals als aktivitätsreguliertes Gen im Hippocampus der Ratte und der Maus beschrieben. Zahlreiche Befunde deuten darauf hin, daß Sgk1 eine Funktion bei Lernen und Gedächtnisbildung haben könnte.

Die Voraussetzung zum Verständnis der physiologischen Funktion von Sgk1 im Hippocampus und anderen Geweben ist die Charakterisierung der Kinase auf zellulärer und molekularer Ebene. Doch obwohl es eine Vielzahl publizierter Arbeiten gibt, die sich mit Funktion und Regulation von Sgk1 beschäftigen, bleiben viele Aspekte unklar oder sind widersprüchlich.

Ziel dieser Arbeit war die systematische Charakterisierung von Sgk1 und die Suche nach ihrer zellulären Funktion. Dazu sollte ein polyklonaler Antikörper generiert und die subzelluläre Lokalisation mit Hilfe verschiedener Ansätze wie Fluoreszenzmikroskopie und subzellulärer Fraktionierungen untersucht werden. Da die subzelluläre Lokalisation von Sgk1 in Abhängigkeit von der Stimulation mit verschiedenen Faktoren variiert, sollten die Bereiche von Sgk1 identifiziert werden, die für die jeweilige Zielsteuerung verantwortlich sind. Ein besonderer Schwerpunkt sollte auf dem N-Terminus der Kinase liegen, da dies der Bereich ist, in dem sich Sgk1 nicht nur von Sgk2 und Sgk3, sondern auch von anderen Kinasen der AGC-Familie unterscheidet.

Ausgehend von der subzellulären Lokalisation der Kinase sollte nach Hinweisen auf ihre zelluläre Funktion gesucht werden. Da Sgk1 mit der Steuerung nukleärer Funktionen in Zusammenhang gebracht wird, sollte mit Hilfe von Genchip-Analysen nach einem Einfluß von Sgk1 auf die Transkription in HEK293 gesucht werden.

Darüberhinaus sollte in dieser Arbeit mit Hilfe von Sgk1<sup>-/-</sup> Tieren die Rolle von Sgk1 im Hippocampus der Maus näher beleuchtet werden.