

3. Ergebnisse

3.1	Herstellung eines polyklonalen Anti-Sgk1-Antikörpers	54
3.2	Nachweis des Sgk1 Genproduktes in transfizierten Zellen und primärem Mausgewebe	55
3.3	Sgk1 ist an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert	57
3.4	Rasche Degradation und subzelluläre Lokalisation von Sgk1 sind miteinander verknüpft	65
3.5	Durch die mitochondriale Lokalisation von Sgk1 wird die Phosphorylierung von NDRG1 begünstigt	66
3.6	Methionin 60 kann als Translationsstart für Sgk1 fungieren	68
3.7	Die Überexpression von Sgk1 hat keinen Einfluß auf die Mitochondrienmorphologie	70
3.8	Sgk1 hat keine keinen Einfluß auf die Transkription in HEK293 Zellen	72
3.9	NDRG1 is ein Phosphorylierungstarget von Sgk1 im Hippocampus der Maus	76

3.1 Herstellung eines polyklonalen Anti-Sgk1-Antikörpers

Vorraussetzung für die Charakterisierung eines Proteins ist ein spezifischer Antikörper. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Gewinnung eines polyklonalen α -Sgk1-Antiserums der C-Terminus von Sgk1 (Aminosäuren 290-431) rekombinant hergestellt und anschließend ein Kaninchen mit diesem Protein immunisiert. Zur Expression des Sgk1 290-431-Fragments in *E.coli* wurde die kodierende cDNA mit Hilfe von Primern mit überhängenden Restriktionsschnittstellen (Sgk1d1-289EcoRI5' & Sgk1pGEX3'AflIII) amplifiziert und via *EcoRI* und *AflIII/NcoI* in das Plasmid pGEX-KG kloniert, welches eine N-terminale Fusion mit der Glutathion S-Transferase erlaubt. Aus pGEX-KG wurde das gleiche Fragment über *EcoRI* und *SalI* in pQE30 kloniert. pQE30 ermöglicht die rekombinante Expression von Proteinen mit einer N-terminalen His₆-tag-Fusion. Nach der Induktion der Proteinexpression zeigte sich, daß beide Fusionsvarianten in *E.coli* zu *inclusion bodies* aggregieren und damit nicht unter nativen Bedingungen aufzureinigen waren. Da die korrekte Faltung eines Proteins keine Voraussetzung für die Affinitätsaufreinigung über einen Hexahistidin-tag darstellt, erfolgte die Aufreinigung von rekombinantem His₆-Sgk1 290-431 unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von 8 M Harnstoff. Um das Protein anschließend bei einer Konzentration von 1 mg/ml in Lösung zu halten, waren wenigstens 1 % SDS oder 6 M Harnstoff notwendig. Während der Aufreinigung von His₆-Sgk1 290-431 zeigte sich, daß sich das Protein auch in Gegenwart von 8 M Harnstoff oder SDS nicht von der üblicherweise für Großaufreinigungen verwendeten Ni-NTA-Agarose eluieren ließ. Es wurden daher für die Aufreinigung im großen Maßstab Ni-NTA-Säulchen mit einem Silicat als Trägermaterial verwendet. Abbildung 3.1 zeigt die Expressionsinduktion sowie das aufgereinigte Fusionsprotein in einem Coomassie-gefärbten Proteingel.

Nach der Ausblutung des Kaninchens wurde zur Gewinnung der IgG-Antikörper ein Teil des Serums über Protein A-Sepharose aufgereinigt und nur noch diese aufgereinigten Antikörper weiterverwendet.

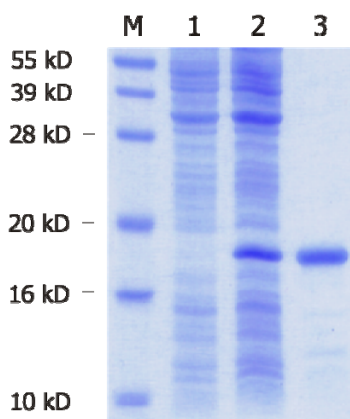


Abbildung 3.1 Rekombinante Expression von His₆-Sgk1 290-431.

Auf einem Coomassie-gefärbten Proteingel wurden zwei *E.coli*-Lysate (Spuren 1 & 2) und das aufgereinigte His₆-Sgk1 290-431-Protein (Spur 3) aufgetrennt. Die Bakterien in Spur 1 wurden mit dem leeren pQE30-Plasmid, die Bakterien in Spur 2 mit pQE30-Sgk1 290-431 transformiert. In beiden Ansätzen wurde die Proteinexpression mit IPTG induziert. Das induzierte sowie das aufgereinigte Fusionsprotein laufen bei etwa 18 kD. In der mit M bezeichneten Spur ist ein Längenstandard aufgetragen.

3.2 Nachweis des Sgk1 Genproduktes in transfizierten Zellen und primärem Mausgewebe

Zum Testen des aufgereinigten α Sgk1 Antikörpers, sowie verschiedener anderer α Sgk1-Antikörper wurden Western Blot-Analysen mit Lysaten von transfizierten HEK293 Zellen durchgeführt. Da der Nachweis des Sgk1-Genproduktes wegen seiner kurzen Halbwertszeit als schwierig gilt, wurden die Zellen nicht nur mit Sgk1, sondern auch mit der Deletionsvariante Sgk1 Δ 1-59 transfiziert, die eine erheblich längere Halbwertszeit hat (Brickley *et al.*, 2002; Bogusz *et al.*, 2006; vergleiche Kapitel 1.4). Desweiteren wurde ein Teil der Transfektanten vier Stunden vor der Analyse mit dem Proteasominhibitor CBZ-L₃-CHO behandelt.

Um die von den transfizierten Plasmiden kodierten Proteine auch unabhängig von α Sgk1-Antikörpern nachweisen zu können, wurden die Proteine mit einem C-terminalen Flag-*tag* fusioniert. Der Flag-*tag* ist ein Oktapeptid mit der Sequenz DYKDDDDK, das durch α Flag-Antikörper erkannt wird. Der *tag* wurde durch eine Oligonukleotid, das gleichzeitig die Stopkodons der Sgk1 Sequenz entfernt und die Sequenz um den *tag* verlängert (Sgk1 EcoRI3'Flag), über eine PCR-Reaktion angefügt. Die komplette Variante wurde mit dem 5' Primer Sgk1BamHI5', die Δ 1-59-Variante mit einem intern bindenden 5' Primer (Sgk1d1-59BamHI5') generiert. Beide Varianten wurden über die zusätzlich eingefügten Restriktionsschnittstellen BamHI und EcoRI in das eukaryotische Expressionsplasmid pcDNA3.1(+) kloniert, welches die Genexpression unter einem starken, konstitutiv aktiven Cytomegalievirus (CMV)-Promotor erlaubt.

Abbildung 3.2A zeigt die Ergebnisse der Western Blot-Analyse. Der in dieser Arbeit hergestellte Antikörper wurde mit den zwei kommerziell erhältlichen α Sgk1-Antikörpern von Sigma und Cell Signaling Technologies, sowie mit zwei publizierten α Sgk1-Seren (Murray *et al.*, 2004; Alvarez de la Rosa *et al.*, 2003a) verglichen. Daneben wurde der α Flag-Antikörper M2 mitgeführt. Im Vergleich zu einem Kontrollansatz, bei dem die Zellen mit der leeren Plasmid transfiziert wurden (sogenannte ‚mock‘-Kontrolle), erkennen alle Antikörper eindeutig die überexprimierte Δ 1-59-Variante knapp über der 40 kD-Markierung. In Abwesenheit des Proteasominhibitors gelang mit keinem der verwendeten Antikörper ein Nachweis des kompletten Sgk1 Proteins. Bei den Transfektanten, die mit CBZ-L₃-CHO behandelt worden waren, erkennen alle Antikörper eindeutig ein Signal bei etwa 52 kD, das Sgk1 entspricht. Die größte Sensitivität zeigten die Antikörper von Sigma, sowie der in dieser Arbeit generierte Antikörper. Die größte Spezifität hatte der Antikörper von Cell Signaling Technologies.

In transfizierten Zellen, die eine sehr hohe Expression von Sgk1 zeigen, gelang der Nachweis von Sgk1 auch ohne Proteasominhibitor nach vergleichsweise langer Exposition des Röntgenfilms (siehe Abbildung 3.2B).

Interessanterweise zeigen die Western Blot-Analysen aller Zellen, die mit kompletter Sgk1 transfiziert worden waren, neben dem erwarteten 50 kD-Signal eine weitere Bande bei etwa 40 kD (Abbildung 3.2). Da alle verwendeten Antikörper gegen den C-Terminus von Sgk1 gerichtet sind, ist anzunehmen, daß diese kürzeren Formen N-terminal trunziert sind (siehe Kapitel 3.6).

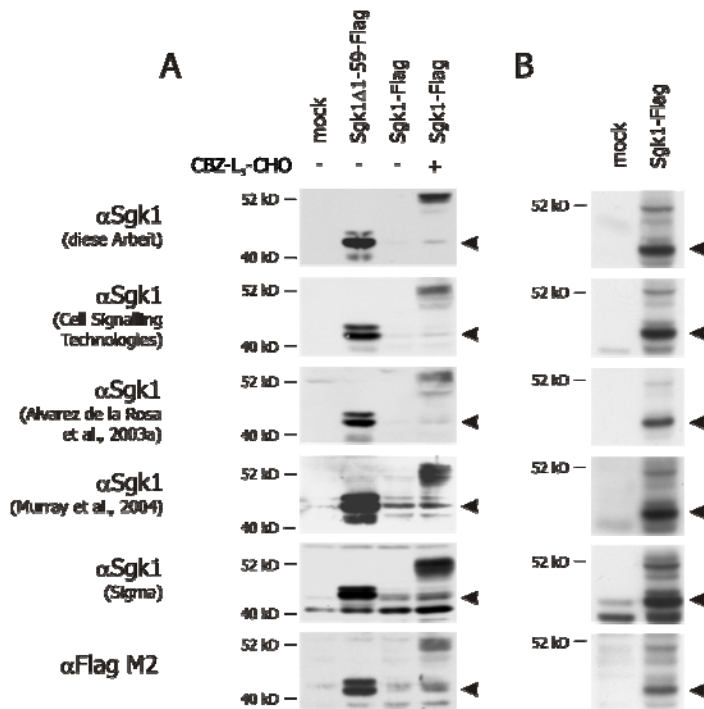


Abbildung 3.2
Western Blot-Analysen zum Nachweis der Sgk1 Proteinexpression in transfizierten HEK293 Zellen.

HEK293 Zellen wurden mit einem leeren Plasmid (mock) oder Sgk1-Flag bzw. Sgk1 Δ 1-59-Flag transfiziert. Alle links aufgeführten Antikörper erkennen die Δ 1-59-Variante und Sgk1 in Gegenwart des Proteasominhibitors CBZ-L₃-CHO (**A**). In der Abwesenheit des Inhibitors wird Sgk1-Flag nur nach langer Filmexposition in Lysaten erkannt, die eine hohe Expression von Sgk1-Flag zeigen (**B**).

Die Pfeilköpfe markieren Banden bei etwa 40 kD, die in allen Sgk1-Flag-transfizierten Zellen auftauchen, und wahrscheinlich N-terminal trunkierte Formen von Sgk1 sind (siehe dazu Kapitel 3.6).

Um zu untersuchen, ob Sgk1 in primärem Mausgewebe nachgewiesen werden kann, wurden einer Sgk1^{-/-} Maus, sowie einem Wildtyp-Geschwister mehrere Organe entnommen, homogenisiert und die Lysate Western Blot-Analysen mit den bereits oben verwendeten fünf α Sgk1-Antikörpern unterzogen. Obwohl mit 135 μ g/Organ eine sehr große Menge Protein eingesetzt wurde und für alle untersuchten Gewebe Sgk1 mRNA-, oder Proteinexpression beschrieben ist (Waldegger *et al.*, 1997; Lang & Cohen, 2001; Alvarez de la Rosa *et al.*, 2003a; Coric *et al.*, 2004), war ein Nachweis von Sgk1 mit keinem der Antikörper möglich (siehe Abbildung 3.3A). Sämtliche Banden im Bereich von 50 kD, in dem das Sgk1-Signal zu erwarten ist, sind unspezifisch, da sie sich auch im Gewebe der Sgk1^{-/-} Maus finden (Abbildung 3.3).

Um die Sgk1-Expression zu erhöhen, wurden in einem parallel durchgeführten Experiment einer Sgk1^{-/-} Maus und einem Wildtyp-Geschwistertier vier Stunden vor der Organentnahme 100 μ g/Kg Körpergewicht Dexamethason intraperitoneal appliziert. Die Western Blot-Analysen der Organlysate mit den beiden sensitivsten α Sgk1-Antikörpern zeigen, daß nur der Antikörper von Sigma endogene Sgk1 erkennt. Die Spezifität der Signale in Leber, Skelettmuskel, Lunge und Gehirn, sowie der sehr schwachen Signale in Niere und Herz wird durch den Vergleich zwischen Wildtyp- und *knockout*-Gewebe bestätigt (siehe Abbildung 3.3B).

Die Ergebnisse dieser Expressionsanalysen zeigen, daß sich die Gesamtmenge an Sgk1 Protein sowohl in Zelllinien, die Sgk1 stark überexprimieren, als auch in stimuliertem primärem Gewebe im Bereich der Nachweisgrenze befinden. Die Probleme der Detektion von Sgk1 sind nicht durch die generell schlechte Qualität der α Sgk1-Antikörper zu erklären, denn auch mit dem etablierten α Flag-Antikörper werden keine besseren Ergebnisse erzielt (siehe Abbildung 3.2A).

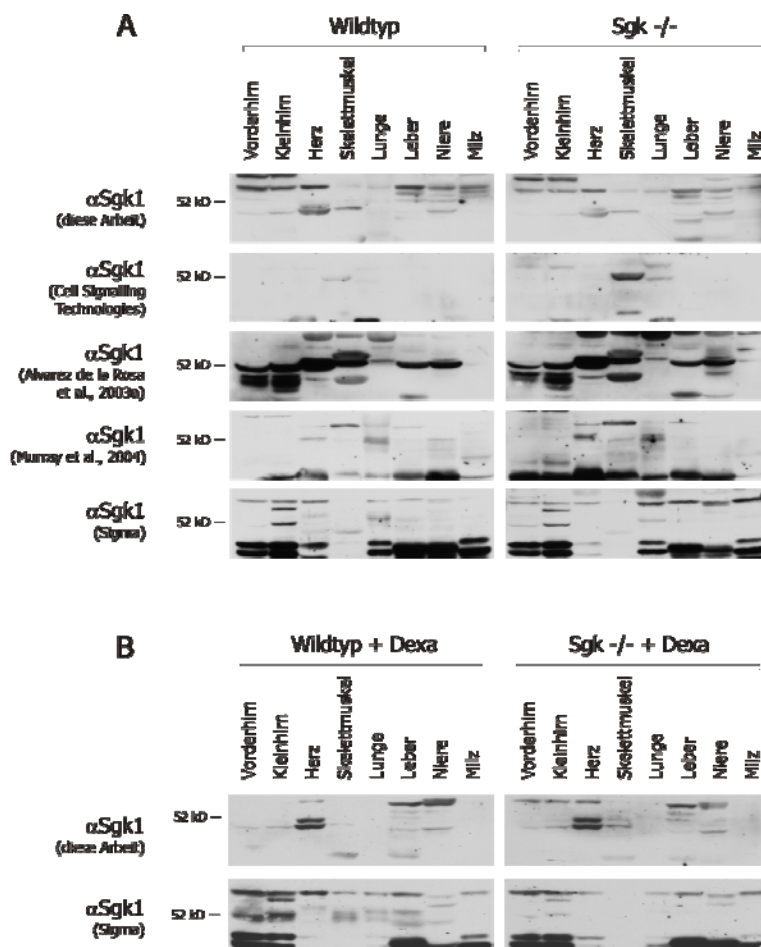


Abbildung 3.3
Western Blot-Analysen zum Nachweis des Sgk1 Proteins in Mausgeweben.

(A) Keiner der links aufgeführten fünf Antikörper erkennt Sgk1 in primärem Mausgewebe. Sämtliche Banden im Bereich von etwa 50 kD, in dem Sgk1-Signale zu erwarten sind, sind unspezifisch, da sie sowohl bei Wildtyp- als auch in *knockout*-Gewebe lysaten vorhanden sind. In jeder Spur sind 135 μ g Protein aufgetragen.

(B) Durch die Applikation von Dexamethason vier Stunden vor der Gewebeentnahme wird Sgk1 soweit hochreguliert, daß das Protein durch den Antikörper von Sigma in Gehirn, Skelettmuskel, Leber und Lunge eindeutig nachgewiesen werden kann. Die korrespondierenden Signale tauchen in Gewebe aus Sgk^{-/-} Mäusen nicht auf. In Herz und Niere finden sich sehr schwache Signale, die ebenfalls im *knockout*-Tier fehlen. Der in dieser Arbeit generierte Antikörper zeigt auch bei stimuliertem Gewebe keine spezifische Reaktivität.

Dexa: Dexamethason

3.3 Sgk1 ist an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert

Nicht nur die subzelluläre Lokalisation von Sgk1 in Zellkern, Cytosol sowie an der Plasmamembran und im ER, sondern auch deren Regulation durch Zellzyklus, Steroide und Serum ist in zahlreichen Publikationen beschrieben worden (siehe Kapitel 1.5 und 1.10). Da die subzelluläre Lokalisation entscheidend für die Funktion eines Protein ist und die publizierten Daten nicht eindeutig und teilweise widersprüchlich sind, sollte in dieser Arbeit die Lokalisation von Sgk1 nach verschiedenen Stimuli in HEK293 Zellen systematisch untersucht werden.

3.3.1 Sgk1-EGFP ist hauptsächlich mitochondrial lokalisiert, nicht jedoch an der Plasmamembran oder im Zellkern

Der PSORT2-Algorithmus zur Vorhersage der subzellulären Lokalisation von Proteinen ermittelt für Sgk1 eine 43,5%ige Wahrscheinlichkeit für eine cytosolische Lokalisation und eine 34,8%ige Wahrscheinlichkeit für eine mitochondriale Lokalisation. TargetP und Mitoprot II, zwei Algorithmen zur Iden-

tifikation von N-terminalen Zielsteuerungssignalen, sagen für die murine Sgk1-Sequenz einen Mitochondrienimport, sowie eine Schnittstelle für die mitochondriale Matrix-Präsequenzpeptidase zwischen R32 und M33 voraus.

Um die Lokalisation von Sgk1 in HEK293 Zellen zu untersuchen, wurde Sgk1 C-terminal mit EGFP fusioniert. Dazu wurde mit Hilfe der Primer Sgk1*Bam*HI5' und Sgk1*Bam*HI3' Sgk1 ohne Stopkodon amplifiziert und via *Bam*HI unter Erhaltung des Leserasters in pEGFP-N3 kloniert. Achtundvierzig Stunden nach der Transfektion des Plasmids wurden die Zellen fixiert und nach einer Kernfärbung mit DAPI durch konfokale Laser Scanning-Mikroskopie analysiert. In den meisten Zellen zeigte sich ein tubulo-retikuläres EGFP-Signal, welches der Morphologie von Mitochondrien in HEK293 Zellen entspricht. Um die mitochondriale Lokalisation von Sgk1-EGFP zu bestätigen, wurden HEK293 mit Sgk1-EGFP und pDsRed2-Mito kotransfiziert. pDSRed2-Mito ist ein Expressionsplasmid für die mit dem rot fluoreszierenden Protein DsRed2 fusionierte Signalsequenz der ausschließlich mitochondrial lokalisierten Untereinheit VIII der Cytochrom C-Oxidase. Die Analyse mit Hilfe der konfokalen Laser Scanning-Mikroskopie zeigt, daß beide Fluoreszenzsignale überlappen und bestätigt damit die mitochondriale Lokalisation von Sgk1-EGFP (siehe Abbildung 3.4). In einigen Zellen waren homogen über die ganze Zelle verteilte Fluoreszenzsignale zu beobachten, jedoch konnte in keiner Zelle eine Färbung der Plasmamembran, oder eine Anreicherung der Signale im Zellkern beobachtet werden.

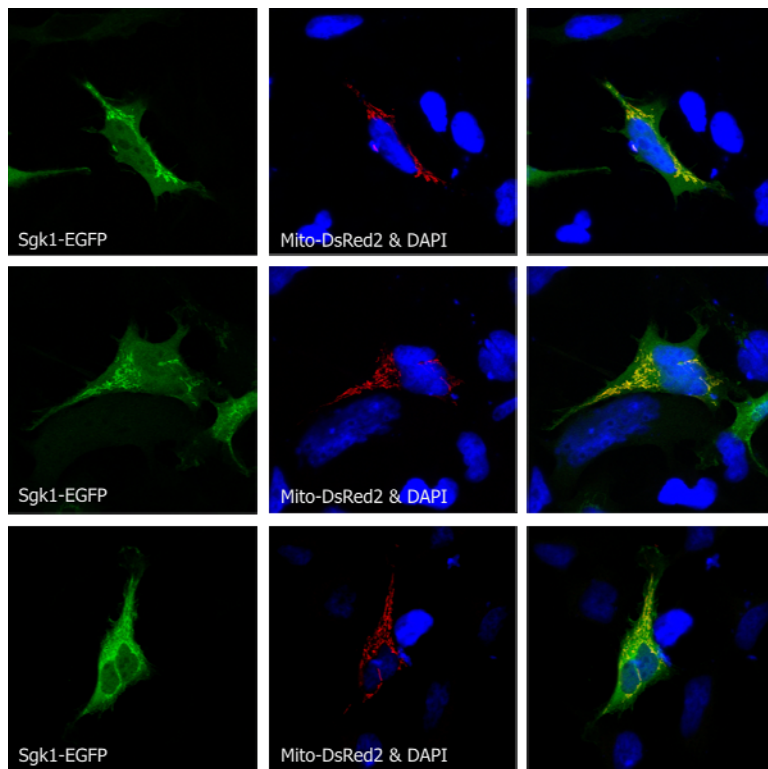


Abbildung 3.4
Sgk1-EGFP zeigt eine mitochondriale Lokalisation in HEK293 Zellen.

HEK293 Zellen wurden mit Sgk1-EGFP und dem Mitochondrienmarker Mito-DsRed2 kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und die Kerne mit DAPI gefärbt. Die Abbildung zeigt drei repräsentative Zellen aus der mikroskopischen Analyse.

Links ist jeweils das Sgk1-EGFP-Fluoreszenzsignal dargestellt, in der Mitte die Kernfärbung (blau), sowie die Mitochondrienfärbung (rot). Auf der rechten Seite ist die Überlagerung der Signale gezeigt.

Serumstimulation und Hitzebehandlung sollten zu einer nukleären Lokalisation von Sgk1 führen, während Sgk1 unter dem Einfluß von Dexamethason in das Cytoplasma transferriert wird (Maiyar *et al.*, 2003; Leong *et al.*, 2003; vergleiche Kapitel 1.5). Diese Beobachtungen konnten in dem hier verwendeten experimentellen System nicht bestätigt werden. Weder eine Stimulation der transfizierten Zellen mit Serum oder Dexamethason, noch eine Hitzebehandlung bei 42°C führten zu einer anderen als der oben beschriebenen subzellulären Lokalisation von Sgk1-EGFP.

3.3.2 *In vitro*-translatierte Sgk1 wird zeitabhängig von Mitochondrien aufgenommen

Um die Mitochondrienassoziation von Sgk1 mit einer weiteren Methode zu bestätigen, wurden Mitochondrienimport-Experimente für *in vitro*-translatierte, radioaktiv markierte Sgk1 durchgeführt. Diese zellfreie Methode bietet den Vorteil, daß Sgk1 nicht der Degradation durch das Proteasom unterliegt und durch Autoradiographie einfach nachgewiesen werden kann.

Sgk1 wurde in Gegenwart von [³⁵S] Methionin/Cystein *in vitro*-translatiert und unter für den Proteinimport optimierten Pufferbedingungen für wenige Sekunden, eine, fünf und 20 Minuten zu einer Suspension reiner Mitochondrien aus Mäusenieren gegeben. Die Organellen wurden aus dem Ansatz pelletiert, und der Proteinimport durch die Analyse sowohl des Pellets, als auch des Überstandes durch Proteinelektrophorese mit anschließende Fluorographie untersucht. Dabei zeigte sich, daß Sgk1 zeitabhängig von den Mitochondrien importiert wird, während die Variante Sgk1 Δ 1-59, der die vorhergesagte Zielsteuerungssequenz fehlt, im Überstand verbleibt. Damit wird gleichzeitig bestätigt, daß die ersten 60 Aminosäuren essentiell sind für die mitochondriale Lokalisation von Sgk1.

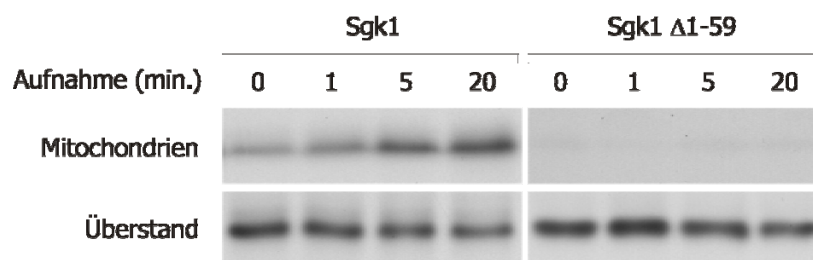


Abbildung 3.5 *In vitro*-Import von Sgk1 und Sgk1 Δ 1-59 durch aufgereinigte Mitochondrien.

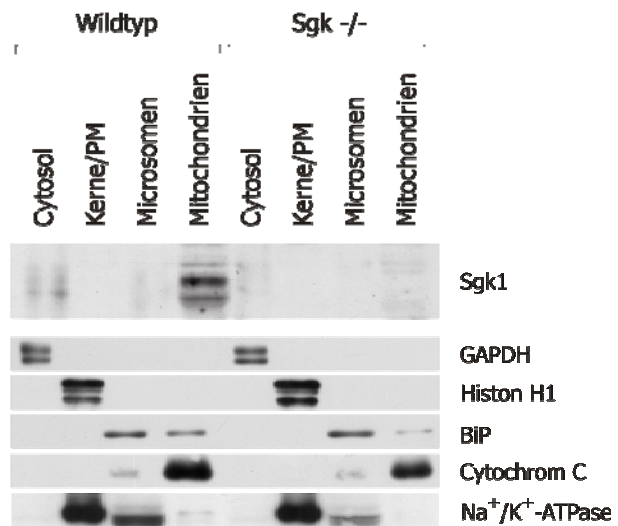
Eine Suspension aufgereinigter Mitochondrien aus Mäusenieren wurde für die angegebenen Zeiten mit *in vitro*-translatierter, radioaktiv-markierter Sgk1, bzw. der Deletionsvariante Sgk1 Δ 1-59 inkubiert. Danach wurden die Mitochondrien pelletiert und sowohl die Organellenlysate, als auch die Überstände elektrophoretisch aufgetrennt und das radioaktiv markierte Protein mit Hilfe der Fluorographie nachgewiesen. Aus experimentellen Gründen kann für den Zeitpunkt 0 eine Importzeit von wenigen Sekunden angenommen werden. Sgk1 wird zeitabhängig in die Mitochondrien aufgenommen, während die Deletionsvariante nur im Überstand nachweisbar ist.

3.3.3 Sgk1 läßt sich *in vivo* in der Mitochondrienfraktion von Mauslebern nachweisen

Um die mitochondriale Lokalisation von Sgk1 *in vivo* nachzuweisen, wurden die Lebern einer Wildtyp-Maus und einer Sgk1^{-/-} Maus präpariert, homogenisiert und durch differentielle Zentrifugation subzellulär in Cytosol, Mitochondrien, Mikrosomen und Zellkerne fraktioniert. Zur Qualitätskontrolle der einzelnen Fraktionen wurden Western Blot-Analysen mit Hilfe von Organellen-spezifischen Antikörpern gegen Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH, Cytosol), Histon H1 (Zellkern), *Immunoglobulin heavy chain binding protein* (BiP, ER bzw. Mikrosomen), Cytochrom C (Mitochondrien) und Na⁺/K⁺-ATPase (Plasmamembran) durchgeführt (siehe Abbildung 3.6). Dabei zeigte sich ein starkes Signal für die Na⁺/K⁺-ATPase in der Kernfraktion, so daß davon auszugehen ist, daß diese Fraktion trotz der Verwendung eines Protokolls zur Präparation reiner Zellkerne auch substantielle Mengen an Plasmamembranbestandteilen enthält.

Abbildung 3.6
Sgk1 ist ein mitochondrial lokalisiertes Protein *in vivo*.

Vier Stunden nach Induktion der Sgk1-Expression durch i.p.-Applikation von Dexamethason wurde die Verteilung des Sgk1-Genproduktes in verschiedene Mausleber-Fractionen durch Western Blot-Analysen untersucht. Um die Sgk1-Signale eindeutig identifizieren zu können, wurde parallel eine Sgk1^{-/-} Maus mitgeführt. Der Nachweis von Sgk1 erfolgte mit dem Antikörper von Sigma. In den fünf unteren Immunoblots wurden Antikörper gegen die Organellenmarker GAPDH (Cytosol), Histon H1 (Zellkern), BiP (ER bzw. Mikrosomen), Cytochrom C (Mitochondrien) und Na⁺/K⁺-ATPase (Plasmamembran, PM) eingesetzt, um die Reinheit der Fraktionen zu demonstrieren.



Bei ersten Experimenten zeigte sich, daß der Nachweis des Sgk1-Genproduktes trotz der mit der Fraktionierung verbundenen Anreicherung in Western Blot-Analysen in keiner der Fraktionen gelang. Ausgehend von der Annahme, daß die basale Expression von Sgk1 auch für eine solche Analyse zu gering ist, wurde Mäusen auch hier vier Stunden vor der Organentnahme Dexamethason intraperitoneal injiziert, um die Expression von Sgk1 zu erhöhen. Bei den Western Blot-Analysen der subzellulären Fraktionen zeigten sich Sgk1-Signale in der Mitochondrienfraktion und sehr schwache Signale im Cytosol und den Mikrosomen. Durch den Vergleich mit den Fraktionen aus einer *knockout* Maus wird die Spezifität der Signale bestätigt. In der Zellkern/Plasmamembran-Fraktion konnte Sgk1 nicht detektiert werden (siehe Abbildung 3.6). Diese Ergebnisse bestätigen die mit Sgk1-EGFP gewonnenen mikroskopischen Daten und belegen, daß Sgk1 auch *in vivo* mitochondrial, jedoch nicht im Zellkern oder an der Plasmamembran lokalisiert ist.

3.3.4 Sgk1 assoziiert über seinen N-Terminus mit der Außenseite der äußeren Mitochondrienmembran

Um den für die Mitochondrienzielsteuerung verantwortlichen Bereich von Sgk1 zu identifizieren, wurden verschiedene Deletionsvarianten der Kinase generiert und mit EGFP fusioniert. Dabei wurde der Schwerpunkt auf die ersten 60 Aminosäuren von Sgk1 gelegt, da dieser das vorhergesagte mitochondriale Targetingssignal enthält (vergleiche Kapitel 3.3.1). Die Sequenz dieses Bereichs ist in Abbildung 3.7 gezeigt. Die Deletionsvarianten beginnen, beziehungsweise enden an M17, M33 und M60 der Sgk1-Sequenz. Für eine Variante, die an Position 48 beginnt, wurde Y47 gegen Methionin ausgetauscht und damit ein Startkodon eingefügt. Alle Varianten wurden über PCR hergestellt und in pEGFP-N3 kloniert. Die verwendeten Primer und Restriktionsschnittstellen lassen sich aus Tabelle 2.3 ableiten. Die Konstrukte Sgk1 17-60-, 33-60-, und 48-60-EGFP wurden aus der Variante Sgk1 1-60-EGFP mit Hilfe des 3' Primers Sgk1-N-No13' und der verschiedenen 5' Primer generiert. Da die durch die 5' Primer eingefügten *Bam*HI-Schnittstellen hier nicht mehr verwendet werden konnten, wurden die 5'-Enden mit T4 Polymerase aufgefüllt und via *Eco*47III in pEGFP-N3 kloniert.

Die Deletionsvarianten wurden in Analogie zu den in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Experimenten mit dem Mitochondrienmarker Mito-DsRed2 in HEK293 Zellen kotransfiziert. Die Zellen wurden 48h nach der Transfektion mit DAPI gefärbt und mit Hilfe der konfokalen Laser Scanning-Mikroskopie analysiert. Repräsentative mikroskopische Bilder der verschiedenen Transfektanten sowie schematische Darstellungen der transfizierten Konstrukte sind in Abbildung 3.8 gezeigt.

Die Analysen zeigen, daß die ersten 16 Aminosäuren keinen Einfluß auf die Mitochondrienzielsteuerung von Sgk1-EGFP haben, da die Variante Sgk1 17-431-EGFP weiterhin mitochondrial lokalisiert ist. Sgk1-EGFP-Varianten, die bei Position 33 oder 48 beginnen, zeigen dagegen ein über die ganze Zelle verteiltes Fluoreszenzmuster, daß sich nicht von dem von EGFP alleine unterscheidet. Daraus läßt sich ableiten, daß die für das Organellentargeting verantwortliche Sequenz hinter M17 beginnt. Um zu untersuchen, ob auch C-terminale Bereiche von Sgk1 einen Einfluß auf die Zielsteuerung haben, wurden parallel N-terminale Sgk1-Deletionsvarianten untersucht, die bereits an Position 60 enden und dort mit EGFP fusioniert sind. Die Mikroskopie von Zellen, die mit den Varianten Sgk1 1-60-EGFP, Sgk1 17-60-EGFP, Sgk1 33-60-EGFP und Sgk1 48-60-EGFP transfiziert wurden, zeigte keine



Abbildung 3.7 Aminosäuresequenz des N-Terminus von Sgk1.

Die ersten 60 Aminosäuren der murinen Sgk1-Sequenz. Die vorhergesagte mitochondriale Zielsteuerungssequenz ist braun hinterlegt. Der Pfeilkopf weist auf eine mögliche Schnittstelle der mitochondrialen Präsequenzpeptidase hin. Die Aminosäurereste, bei denen die in dieser Arbeit generierten Deletionsvarianten beginnen, sind fett gedruckt. Für die bei Position 48 beginnende Variante wurde Y47 gegen Methionin ausgetauscht.

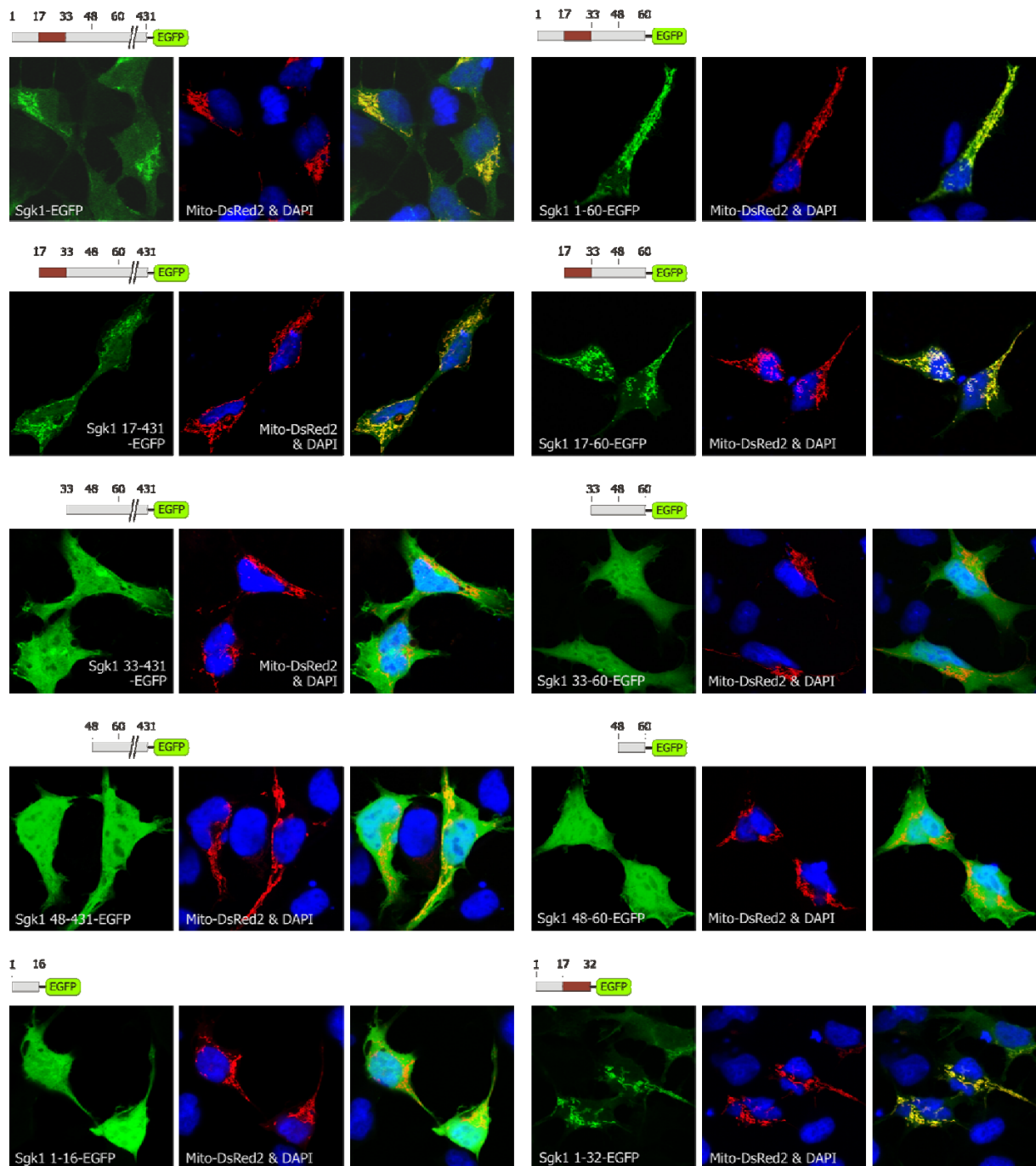


Abbildung 3.8 Die Aminosäurereste 17-32 sind ausreichend und notwendig für die mitochondriale Zielsteuerung von Sgk1.

HEK293 Zellen wurden mit Sgk1-EGFP bzw. den angegebenen Deletionsvarianten und dem Mitochondrienmarker Mito-DsRed2 kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und die Kerne mit DAPI gefärbt. Links ist jeweils das Sgk1-EGFP-Fluoreszenzsignal dargestellt, in der Mitte die Kernfärbung (blau), sowie die Mitochondrienfärbung (rot). Auf der rechten Seite ist die Überlagerung der Signale gezeigt. Über den mikroskopischen Bildern sind die transfizierten Sgk1-Varianten jeweils schematisch dargestellt. Der braun eingefärbte Teil hebt den für die Zielsteuerung des Protein verantwortlichen Sequenzabschnitt hervor.

Unterschiede zwischen diesen und den langen Varianten, was gegen einen Einfluß des C-Terminus auf die Lokalisation spricht. Bei der Analyse der Variante Sgk1 1-16-GFP zeigte sich im Gegensatz zu Sgk1 1-33-EGFP kein mitochondriales Verteilungsmuster. Aus der Zusammenschau all dieser Daten kann gefolgert werden, daß der Bereich zwischen den Aminosäuren 17 und 32, der als mitochondriale Zielsteuerungssequenz vorhergesagt wird, notwendig und ausreichend für die mitochondriale Lokalisation von Sgk1 ist.

Mitochondriale Proteine können in der Matrix, im Intermembranraum, oder an einer der beiden mitochondrialen Membranen lokalisiert sein. Um die exakte mitochondriale Lokalisation von Sgk1 zu bestimmen, wurde zunächst die Membranassoziation von Sgk1 untersucht. Dazu wurde postnukleärer Überstand aus Mäusenieren für 20 min. mit radioaktiv markiertem, *in vitro*-translatiertem Sgk1 Protein inkubiert. Die Mitochondrien wurden aus dem Ansatz pelletiert und in eine Membranfraktion und eine lösliche Fraktion separiert. Abbildung 3.9 zeigt, daß sich das importierte Protein ausschließlich in der Membranfraktion nachweisen läßt. Die Membranassoziation bleibt auch nach einer Behandlung mit 100 mM Natriumcarbonat erhalten. Unter diesen Bedingungen werden periphere Membranproteine wie Cytochrom C, das durch elektrostatische Kräfte mit der inneren Mitochondrienmembran assoziiert (Uren *et al.*, 2005) und hier als Kontrolle verwendet wurde, aus Membranen herausgelöst, während integrale Proteine in der Membranfraktion verbleiben. Diese Befunde sprechen dafür, daß Sgk1 ein integrales Membranprotein ist, obwohl das Protein keinen Bereich besitzt, der als komplette Transmembrandomäne in Frage kommt, wie Analysen mit Hilfe des Kyte-Doolittle Plots und des Vorhersagealgorithmus TMHMM ergeben.

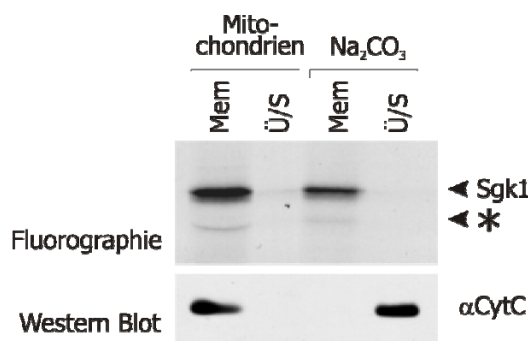


Abbildung 3.9 Sgk1 assoziiert mit Mitochondrienmembranen

In Mitochondrien importierte, radioaktiv markierte Sgk1 assoziiert mit der mitochondrialen Membranfraktion (Mem). Im Überstand (Ü/S) über pelletierten Mitochondrienmembranen läßt sich Sgk1 auch nach einer Behandlung mit Natriumcarbonat (Na₂CO₃) nicht nachweisen. Der obere Teil der Abbildung zeigt die Fluorographie der [³⁵S]-markierten Kinase. Der Stern deutet auf eine zweite Bande, die gelegentlich bei der *in vitro*-Translation von Sgk1 auftaucht. Der untere Teil zeigt eine Western Blot-Analyse der gleichen Proben mit einem gegen Cytochrom C (CytC) gerichteten Antikörper. Cytochrom C ist ein peripheres Membranprotein, das nach Natriumcarbonat-Behandlung aus der Membranfraktion gelöst wird.

Die Tatsache, daß Sgk1 von cytosolisch lokalisierten Kinasen aktiviert wird (vergleiche Kapitel 1.3), läßt vermuten, daß Sgk1 mit der äußeren Mitochondrienmembran assoziiert ist und sich der größte Teil des Proteins mit der Kinasedomäne und dem C-Terminus auf der cytosolischen Seite der Membran befindet. Um diese Annahme zu testen, wurden *Protease Protection Assays* durchgeführt, bei denen intakte Mitochondrien mit Proteinase K behandelt wurden. Die Protease kann die äußere Mitochondrienmembran nicht permeieren und bewirkt die Degradation von Proteinen auf der Mitochondrienoberfläche. Auch bei diesen Experimenten wurde ein postnukleärer Überstand mit *in vitro* transla-

tierter, radioaktiv markierter Sgk1 inkubiert, aus dem anschließend die Mitochondrien pelletiert wurden. Als Kontrolle für die Fähigkeit der Mitochondrien zum korrekten Proteinimport wurde in einem Parallelansatz das zum Citratzyklus gehörende mitochondriale Matrixenzym Fumarase importiert. Die Integrität der mit Proteinase K behandelten Mitochondrien wurde durch Western Blot-Analysen mit Antikörpern gegen das Matrixprotein *heat shock protein 60* (Hsp60) und das im Intermembranraum lokalisierte Protein Smac/Diablo überprüft. Mit Hilfe eines Antikörpers gegen das ebenfalls im Intermembranraum lokalisierte Cytochrom C, das extrem resistent gegen die hier benutzte Proteinase K ist, wurde die eingesetzte Proteinmenge kontrolliert. Die Ergebnisse der *Protease Protection Assays* zeigen, daß Sgk1 durch die Protease in Fragmente degradiert wird, die zu klein sind, um durch die Gelelektrophorese aufgelöst zu werden, wohingegen Hsp60 und Smac/Diablo in Abwesenheit des Detergenz TX-100 vor der Protease geschützt sind (siehe Abbildung 3.10). Aus dem kompletten Verdau von Sgk1 in diesen Experimenten ergibt sich eine weitgehend cytoplasmatische Lokalisation der Kinase.

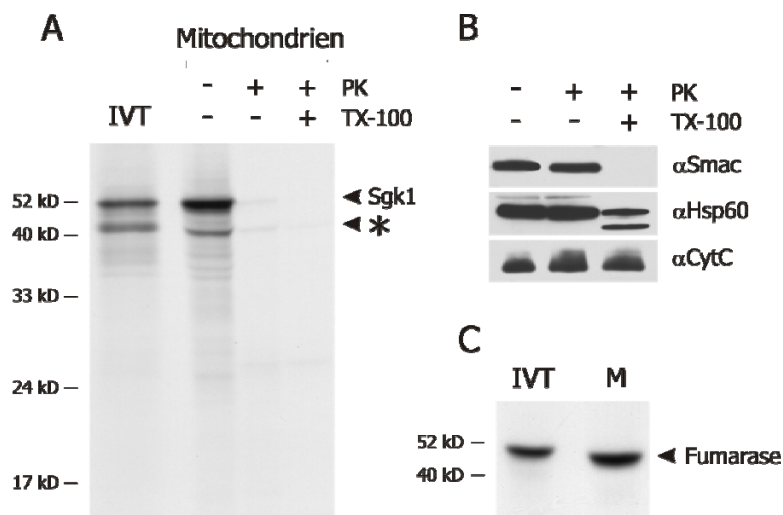


Abbildung 3.10 Sgk1 befindet sich auf der cytosolischen Seite der äußeren Mitochondrienmembran

Nach dem Import von *in vitro* translatierter, radioaktiv markierter Sgk1 in Mitochondrien wurde die Organellensuspension in Gegenwart und Abwesenheit des Detergenz TX-100 mit 200 µg/ml Proteinase K (PK) behandelt. **(A)** Die Fluorographie der importierten Sgk1 zeigt eine komplette Degradation des Proteins durch Proteinase K. IVT: *in vitro* translatiertes Protein vor dem Import. Der Stern deutet auf eine zweite Bande, die gelegentlich bei der *in vitro*-Translation von Sgk1 auftaucht (vergleiche Kapitel 3.6). **(B)** Zur Überprüfung der Integrität der Mitochondrien wurden Western Blot-Analysen von Aliquots der *Protease Protection Assays* mit Antikörpern gegen die Intermembranraumproteine Smac/Diablo (αSmac) und Cytochrom C (αCytC), sowie das Matrixprotein Hsp60 durchgeführt. Smac/Diablo und Hsp60 werden nur nach Permeabilisierung der Organellen durch TX-100 von der Protease verdaut. Durch den Nachweis von Cytochrom C, das unter den verwendeten Bedingungen resistent gegen Proteinase K ist, wird bestätigt, daß alle Ansätze gleiche Mengen an Mitochondrien enthielten. **(C)** Die funktionelle Intaktheit der verwendeten Mitochondrien wurde durch den Import von *in vitro* translatierter, radioaktiv markierter Fumarase, einem mitochondrialen Matrixenzym, bestätigt. Importierte Fumarase (M) läuft durch die Abspaltung der Präsequenz durch die mitochondriale Präsequenzpeptidase geringfügig schneller als das *in vitro*-Translationsprodukt (IVT).

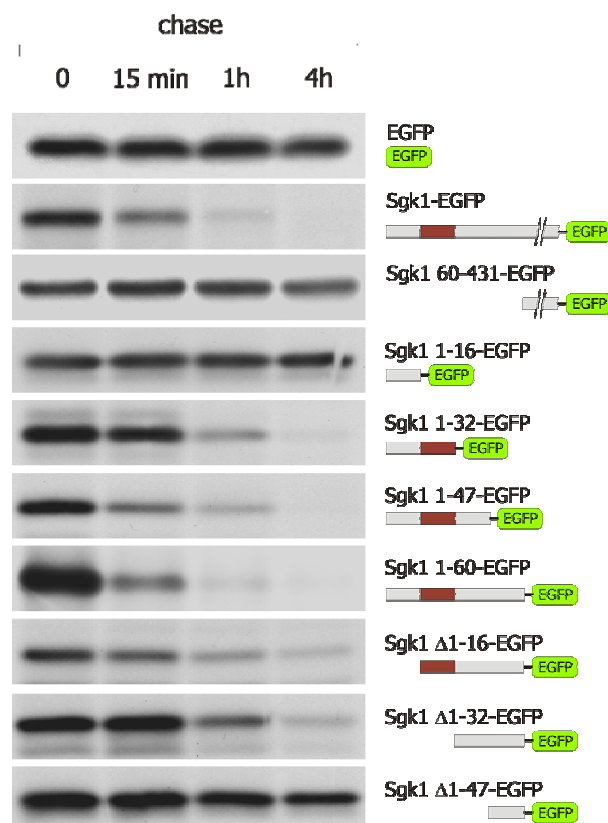
3.4 Rasche Degradation und subzelluläre Lokalisation von Sgk1 sind miteinander verknüpft

Da der N-Terminus von Sgk1 nicht nur die Zielsteuerung des Proteins, sondern auch seine kurze Halbwertszeit terminiert (Brickley *et al.* 2002; Bogusz *et al.*, 2006), sollte mit Hilfe von *Pulse-Chase* Experimenten (siehe Kapitel 2.12) untersucht werden, ob die gleichen Bereiche der ersten 60 Aminosäuren, die das Organellen-Targeting bestimmen, auch für den raschen Abbau verantwortlich sind. Dazu wurden Expressionsvektoren für EGFP-Fusionsproteine mit verschiedenen Deletionsvarianten des N-Terminus von Sgk1 in HEK293 Zellen elektroporiert. Es handelt sich dabei um die gleichen Konstrukte, die schon für die Laser Scanning-Mikroskopie eingesetzt wurden (vergleiche Kapitel 3.3.1). Die EGFP-Fusion ermöglicht in diesem Experiment (1) eine Auftrennung der sonst sehr kleinen Proteinfragmente über gewöhnliche SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese und (2) die Immunpräzipitation mit Hilfe eines α -EGFP-Antiserums. Als Kontrolle für den Einfluß von EGFP wurde ein Plasmid mitgeführt, das nur EGFP exprimiert. Etwa 42 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 10 min. mit [35 S] Methionin und [35 S] Cystein markiert. Während der *chase*-Periode wurden zum Zeitpunkt 0, 15 min., 60 min. und 4 h jeweils gleiche Mengen der Zellsuspension entnommen und lysiert. Mit Hilfe eines α -EGFP-Antiserums (siehe Kapitel 2.3) wurden die radioaktiv markierten Fusionsproteine aus dem Ansatz immunpräzipitiert, anschließend über 12%ige Polyacrylamidgele aufgetrennt und mit Hilfe der Fluorographie auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

Abbildung 3.11

Die kurze Halbwertszeit von Sgk1 wird durch die Aminosäurereste 17-47 terminiert.

Sgk1-EGFP Fusionsproteinvarianten und EGFP wurden in HEK293 Zellen transfiziert, *Pulse-Chase* Analysen unterzogen und mit einem α EGFP-Antiserum immunpräzipitiert. Die *Chase*-Zeitpunkte sind oben angegeben. Die transfizierten Varianten sind rechts in Analogie zu Abbildung 3.9 schematisch dargestellt. Der braun hervorgehobene Abschnitt markiert den für die Mitochondrienzielsteuerung relevanten Bereich.



In Abbildung 3.11 sind die Ergebnisse der *Pulse-Chase*-Analysen zusammengefaßt. Wie zu erwarten, zeigt Sgk1-EGFP im Gegensatz zu Sgk1 60-431-EGFP und EGFP allein einen raschen Abbau und ist bereits nach einer Stunde kaum noch nachzuweisen. Die Varianten Sgk1 1-16-EGFP und Sgk1 48-60-EGFP zeigen die gleiche Stabilität wie Sgk1 60-431-EGFP und EGFP, was bedeutet, daß die Regionen zwischen den Aminosäuren 1-16 und 48-60 keinen Einfluß auf die Halbwertszeit von Sgk1 haben. Dagegen werden alle Varianten, die die Aminosäuren 17-32 oder 33-47 enthalten, innerhalb des untersuchten Zeitraums fast komplett degradiert. Die Information für die kurze Halbwertszeit von Sgk1 ist also in diesen beiden Sequenzabschnitten enthalten. Die mitochondriale Lokalisation und der schnelle Abbau von Sgk1 sind daher nicht voneinander zu trennen.

3.5 Durch die mitochondriale Lokalisation von Sgk1 wird die Phosphorylierung von NDRG1 begünstigt

Wenn Sgk1 an der äußeren Mitochondrienmembran kompartmentalisiert ist und dort seine physiologische Funktion erfüllt, so ist anzunehmen, daß bei Entfernung des Zielsteuerungssignals die Phosphorylierung von Targetproteinen ineffizient ist. NDRG1 und NDRG2 sind die einzigen Proteine, von denen unter Zuhilfenahme von Sgk1-/- Mäusen gezeigt werden konnte, daß sie Aminosäurereste besitzen, die ausschließlich durch Sgk1 phosphoryliert werden (vergleiche Kapitel 1.13 und Abbildung 1.8). Die Phosphorylierung von NDRG1 wurde daher als Maßstab der spezifischen Sgk1-Kinaseaktivität herangezogen und mit Hilfe eines phosphospezifischen Antikörpers (Murray *et al.*, 2004) untersucht.

Bei den Western Blot-Analysen von mit den EGFP-fusionierten Deletionsvarianten transfizierten HEK293 Zellen zeigte sich im Vergleich zu Wildtyp Sgk1 praktisch keine reduzierte Fähigkeit zur Phosphorylierung von NDRG1 (Abbildung 3.12). Mit diesem Experiment wurde gleichzeitig bestätigt, daß die Kinasefunktion durch die C-terminale Fusion mit EGFP nicht beeinträchtigt wird.

Bei dem in Abbildung 3.12 gezeigten Experiment wurden gleiche DNA-Mengen jedes Plasmids transfiziert. Da jedoch die mitochondrial lokalisierten Sgk1-Varianten instabil sind (vergleiche Kapitel 3.4), könnte der Konzentrationseffekt von Sgk1 an der äußeren Mitochondrienmembran durch eine unphysiologisch große Menge an Kinasemolekülen im Cytosol ausgeglichen worden sein. Wie zu erwarten, zeigen die Western Blot-Analysen (Abbildung 3.12) eine vielfach größere Menge Sgk1-Protein bei den nicht mitochondrial lokalisierten Varianten.

Um die Effizienz von Sgk1 mit und ohne Mitochondrienlokalisierungssignal bei der Phosphorylierung von NDRG1 besser vergleichen zu können, wurden in drei Parallelansätzen ein Expressionplasmid für Sgk1 Δ 1-32, also eine Variante, der die mitochondriale Zielsteuerungssequenz fehlt, und der hundertfache Überschuss eines Expressionsplasmids für Wildtyp Sgk1 in HEK293 Zellen transfiziert. Darüberhinaus wurden drei verschiedene DNA-Mengen eingesetzt: 0,5 μ g, 1 μ g und 2 μ g für Wildtyp Sgk1 und 5 ng, 10 ng und 20 ng für Sgk1 Δ 1-32. Abbildung 3.13 zeigt, daß NDRG1 zwar durch beide Varianten modifiziert wird, daß die Phosphorylierung durch Wildtyp Sgk1 bei einer vergleichbaren Kopienzahl von Kinasemolekülen aber effektiver ist. Die Ergebnisse legen nahe, daß die Effizienz dieser Funktion von Sgk1 von ihrer mitochondrialen Lokalisation abhängt.

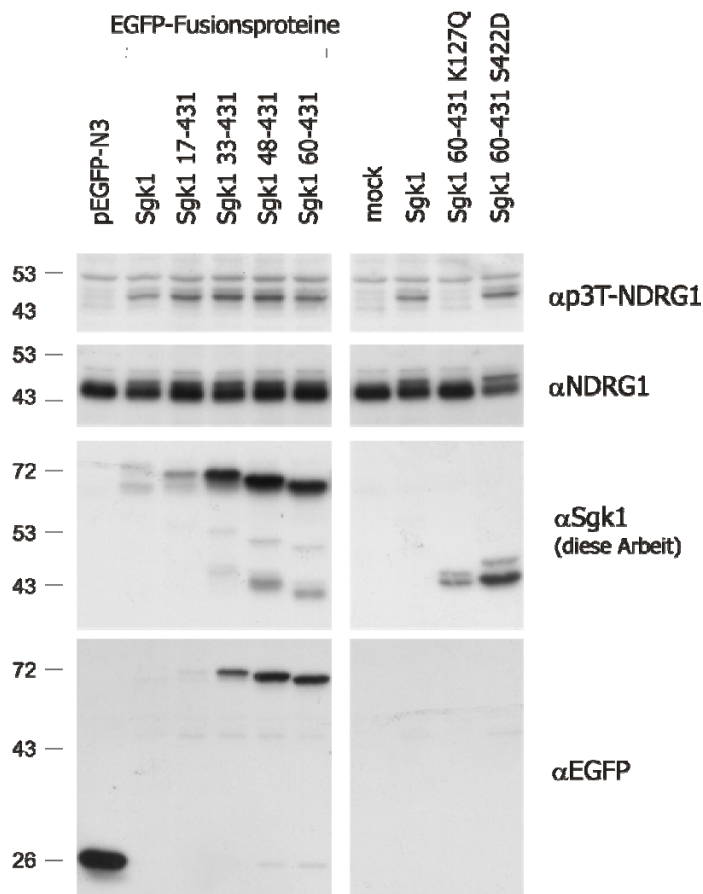


Abbildung 3.12

Die N-terminalen Deletionsvarianten von Sgk1 haben eine vergleichbare Fähigkeit zur Phosphorylierung von NDRG1.

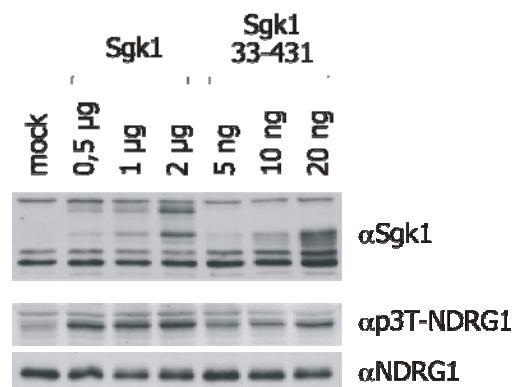
HEK293 Zellen wurden mit den bereits oben beschriebenen EGFP-fusionierten Sgk1 Deletionsvarianten, mit EGFP alleine (pEGFP-N3), mit Wildtyp Sgk1 mit und ohne EGFP-Fusion, sowie mit der N-terminal truncierten, konstitutiv aktiven Variante 60-431 S422D und einer inaktiven, N-terminal truncierten Variante (60-431 K127Q) transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden Zellysate hergestellt und Western Blot-Analysen mit Antikörpern gegen Sgk1, EGFP, NDRG1 und phospho-NDRG1 durchgeführt. Der phosphospezifische Antikörper (α p3T-NDRG1) erkennt drei durch Sgk1 phosphorylierte Threoninreste (Murray *et al.*, 2004, vergleiche Abbildung 1.8).

Die Blots zeigen, daß alle Sgk1-Varianten mit Ausnahme der inaktiven Form in der Lage sind, NDRG1 zu phosphorylieren. Der Grad der Phosphorylierung ist dabei zwischen allen Varianten vergleichbar. Keine NDRG1-Phosphorylierung läßt sich nach Transfektion von EGFP alleine und nach Transfektion des leeren Expressionplasmids pcDNA3.1(+) (mock) detektieren. Die Zahlen links geben die molekulare Masse in kD an. Die Varianten K127Q und S422D wurden durch PCR generiert.

Abbildung 3.13

Wildtyp Sgk1 phosphoryliert NDRG1 effektiver als eine nicht mitochondrial lokalisierte Variante.

Um die Effizienz von Wildtyp Sgk1 und der Variante Sgk1 33-431, die nicht mitochondrial lokalisiert ist, vergleichen zu können, wurden HEK293 Zellen mit 0,5 μ g, 1 μ g und 2 μ g pcDNA3.1(+)-Sgk1, und je einem hundertstel der Menge eines entsprechenden Expressionsplasmids für Sgk1 33-431 transfiziert. Die zwei Tage nach der Transfektion durchgeführten Western Blot-Analysen der Lysate zeigen, daß bei vergleichbaren Mengen von Kinasmolekülen (oberster Blot) die Wildtyp-Variante NDRG1 effektiver phosphoryliert (mittlerer und unterer Blot). In der mit mock bezeichneten Spur ist ein Lysat von Zellen aufgetragen, die mit dem leeren Expressionsplasmid pcDNA3.1(+) transfiziert wurden.



Um die subzelluläre Lokalisation von NDRG1 in HEK293-Zellen zu studieren, wurde das Protein C-terminal mit EGFP fusioniert. Dazu wurde über PCR mit den Primern NDRG1*EcoRI*5' und NDRG1*BamHI*3' ein NDRG1-Fragment ohne Stop-Kodon generiert und unter Erhaltung des Leserasters in pEGFP-N1 kloniert. Das so entstandene Plasmid wurde zusammen mit dem Mitochondrienmarker Mito-DsRed2 in HEK293 Zellen transfiziert und die Zellen mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie analysiert. Um zu untersuchen, ob die Überexpression von Sgk1 einen Einfluß auf die Lokalisation von NDRG1 hat, wurde in einem zweiten Ansatz zusätzlich Sgk1 kotransfiziert. In Abbildung 3.14 sind zwei typische Zellen der Analyse gezeigt. Die Fluoreszenzsignale von NDRG1-EGFP sind über die gesamte Zelle verteilt und zeigen keine Assoziation zu bestimmten Organellen, insbesondere nicht zu den Mitochondrien. Dieses Verteilungsmuster ändert sich auch nicht nach Überexpression von Sgk1, was darauf hindeutet, daß Sgk1 die cytoplasmatisch-nukleäre Lokalisation von NDRG1 nicht beeinflusst.

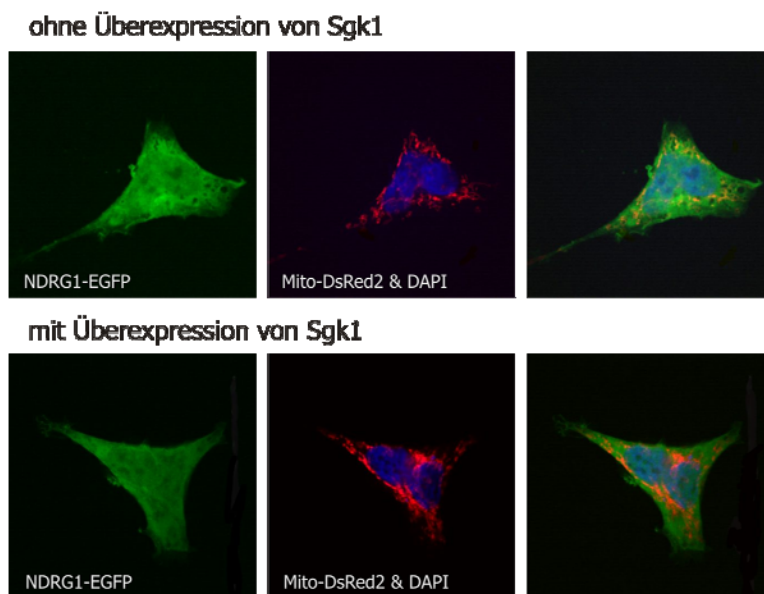


Abbildung 3.14
NDRG1-EGFP zeigt eine cytosolische und nukleäre Lokalisation.

HEK293 Zellen wurden mit NDRG1-EGFP und dem Mitochondrienmarker Mito-DsRed2 transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und die Kerne mit DAPI gefärbt. Es ist jeweils eine repräsentative Zelle aus den mikroskopischen Analysen dargestellt. Links ist jeweils das NDRG1-EGFP-Fluoreszenzsignal gezeigt, in der Mitte die Kernfärbung (blau), sowie die Mitochondrienfärbung (rot). Auf der rechten Seite ist die Überlagerung der Signale gezeigt. Die Überexpression von Sgk1 verändert das Fluoreszenzmuster von NDRG1-EGFP nicht (untere Zelle).

3.6 Methionin 60 kann als Translationsstart für Sgk1 fungieren

Bei den Western Blot-Analysen von transfizierten HEK293 Zellen zeigte sich, daß mit Hilfe aller verwendeten Antikörper neben der erwarteten Bande für Sgk1 bei etwa 50 kD eine zweite Bande bei ca. 40 kD detektiert werden konnte (siehe Abbildung 3.2). Da alle verwendeten Antikörper gegen den C-Terminus von Sgk1 gerichtet sind, kann gefolgert werden, daß es sich dabei um N-terminal trunkierte Formen handelt.

Interessanterweise zeigen diese Formen exakt das gleiche Laufverhalten wie eine Sgk1 Deletionsvariante, die bei M60 beginnt (Sgk1 60-431, vergleiche Abbildung 3.2). Methionin wird vom Startkodon ATG kodiert, so daß M60 ein alternativer Translationsstart für Sgk1 sein könnte. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden zwei Varianten von Sgk1 hergestellt, bei denen (1) M1, und (2) M60 gegen Alanin ausgetauscht wurden. Die Varianten wurde über eine Mutagenese-PCR mit dem Primer Sgk1-M1A*Bam*HI5', bzw. dem Primerpaar Sgk1-M60A-for und Sgk1-M60A-rev generiert und in das eukaryotische Expressionsplasmid pcDNA3.1(+) kloniert. Wenn M60 als Translationsstart benutzt werden kann, sollte die Bande bei ca. 40 kD bei der Variante Sgk1 M60A nicht mehr nachweisbar sein. Bei der Variante M1A hingegen könnte M60 bevorzugt benutzt werden, da das erste Startkodon des Leserasters wegfällt. Die Varianten wurden sowohl in Gegenwart von [³⁵S] Methionin *in vitro* translatiert, als auch in HEK293 Zellen transfiziert und durch Immunoblots detektiert.

Wie Abbildung 3.15 zeigt, läßt sich die 40 kD-Bande mit beiden Ansätzen bei Wildtyp Sgk1 nachweisen, wenn sie auch bei der *in vitro*-Translation deutlich schwächer ist. Die Variante Sgk1 M1A verhält sich genauso wie die als Kontrolle mitgeführte Deletionsvariante Sgk1 17-431, die bei dem zweiten Methionin-Rest (M17) beginnt. Daraus kann abgeleitet werden, daß bei Fehlen von M1 M17 als bevorzugter Translationsstart benutzt wird. Zusätzlich ist sowohl bei Sgk1 M1A, als auch bei Sgk1 17-431 die 40 kD-Bande deutlich stärker ausgeprägt als bei Wildtyp Sgk1. Da diese Bande in beiden Ansätzen bei der Variante Sgk1 M60A fehlt, kann angenommen werden, daß M60 als zusätzlicher Translationstart verwendet werden kann.

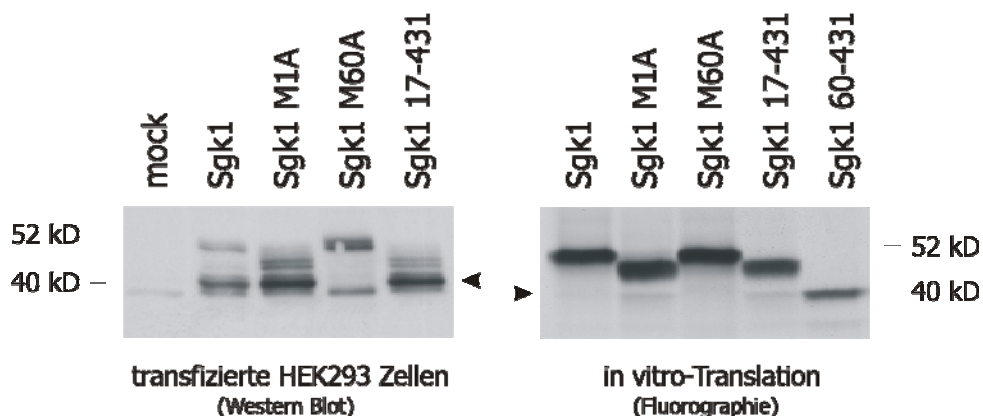


Abbildung 3.15 Methionin 60 kann als Translationsstart von Sgk1 fungieren.

Die oben angegebenen Varianten von Sgk1 wurden in HEK293 Zellen transfiziert (links) oder in Gegenwart von [³⁵S] Methionin *in vitro* translatiert (rechts). 48 h nach der Transfektion wurden Lysate der Zellen hergestellt und Western Blot-Analysen mit einem α Sgk1-Antikörper (Sigma) durchgeführt. In der mit mock bezeichneten Spur sind Lysate von Zellen, die mit dem leeren Expressionsplasmid transfiziert wurden, aufgetragen. Die *in vitro*-translatierten Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe der Fluorographie detektiert. Die Pfeilköpfe in der Mitte der Abbildung weisen auf die 40 kD-Form von Sgk1 hin (vergleiche auch Abbildung 3.2), die auf gleicher Höhe wie die Variante Sgk1 60-431 läuft.

Theoretisch könnte die 40 kD-Bande auch auf einer proteolytischen Prozessierung von Sgk1 beruhen. In diesem Fall wäre zu fordern, daß M60 Teil einer Erkennungssequenz für eine Protease ist, da die 40 kD-Form bei der M60A-Variante nicht beobachtet wird. Da es praktisch ausgeschlossen ist, daß ein von einer Protease erkanntes Motiv nur aus einem Aminosäurerest besteht, wurden 15 weitere Aminosäuren in der Umgebung von M60 gegen Alanin ausgetauscht und diese Varianten auf das Vorhandensein der 40 kD-Bande untersucht. Alle Varianten wurden wie oben beschrieben über Mutagenese-PCR erzeugt (für die verwendeten Primer siehe Tabelle 2.4) und via *Bam*HI und *Eco*RI in pcDNA3.1(+) kloniert. Die Expressionsplasmide wurden in Analogie zu den oben beschriebenen Experimenten in HEK293 Zellen transfiziert und die Varianten über Western Blot-Analysen detektiert. Abbildung 3.16 zeigt, daß die 40 kD-Bande ausschließlich bei der M60A-Variante fehlt, so daß eine spezifische proteolytische Spaltung von Sgk1 in diesem Bereich als unwahrscheinlich einzustufen ist.

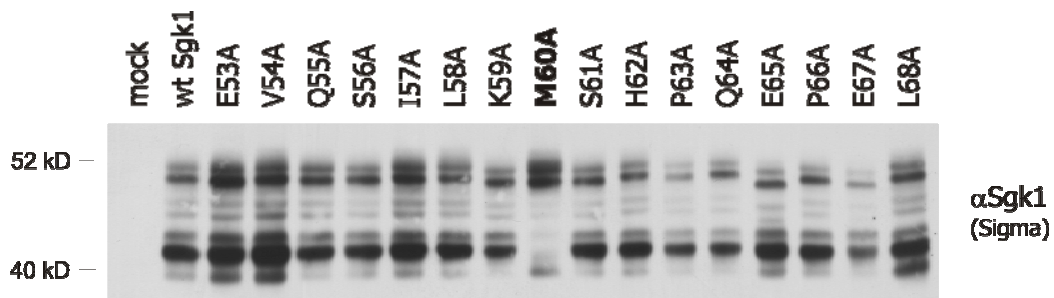


Abbildung 3.16 Nur der Austausch M60A führt zum Verschwinden der 40 kD-Bande
HEK293 wurden mit dem leeren Expressionsplasmid (mock), mit Wildtyp Sgk1 (wt) und mit den oben angegebenen Mutationsvarianten transfiziert. Die zwei Tage nach der Transfektion durchgeführten Western Blot-Analysen der Lysate mit einem Antikörper gegen Sgk1 zeigen, daß nur bei dem Austausch M60A die unteren Banden fehlen. Durch die weite Auftrennung des Gels wird außerdem sichtbar, daß es sich bei den Banden bei ca. 50 kD und 40 kD jeweils um Doppelbanden handelt.

3.7 Die Überexpression von Sgk1 hat keinen Einfluß auf die Mitochondrienmorphologie

Eine Funktion, die für ein auf der Mitochondrienoberfläche lokalisiertes Protein in Frage kommt, ist eine Beteiligung an der Regulation von Teilung oder Verschmelzen der Mitochondrien. In den letzten Jahren konnten z.B. mit *Dynamin-Related Protein 1* (DRP1), Fis1, OPA1 oder den Mitofusinen einige Proteine identifiziert werden, die an diesen Prozessen bei Säugetieren beteiligt sind (Chan, 2006). Alle diese Proteine lassen sich auf der Oberfläche der Organellen nachweisen und sind mit der äußeren Membran assoziiert.

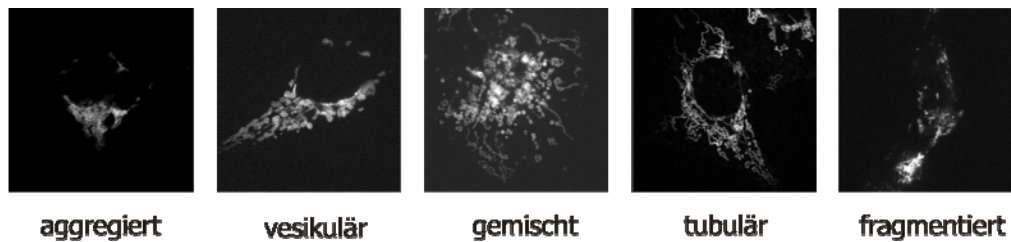


Abbildung 3.17 Verschiedene Mitochondrienmorphologien in HEK293 Zellen

Fünf verschiedene Mitochondrienformen wurden nach der Transfektion mit dem Mitochondrienmarker Mito-DsRed2 in HEK293 Zellen identifiziert

Um systematisch zu untersuchen, ob Sgk1 einen Einfluß auf Fusion oder Teilung von Mitochondrien hat, wurden HEK293 Zellen mit dem Mitochondrienmarker Mito-DsRed2 transfiziert und entweder mit dem leeren Expressionplasmid pcDNA3.1(+), oder mit einem Expressionplasmid für Sgk1 kotransfiziert. Die Transfektionen wurden in drei Parallelansätzen durchgeführt und anschließend die Morphologie der Mitochondrien durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Sollte sich durch die Überexpression von Sgk1 eine veränderte Mitochondrienmorphologie zeigen, so wäre dies ein Hinweis auf eine Beteiligung von Sgk1 an der Regulation der Organellendynamik. Die Bestimmung und Kategorisierung der Mitochondrienformen erfolgte nach dem von Niemann und Koautoren verwendeten Schema (Niemann *et al.*, 2005). Dabei wird zwischen aggregierten, tubulären, gemischten, vesikulären und fragmentierten Formen unterschieden. Zunächst wurde untersucht, ob die hier verwendeten HEK293 Zellen die gleichen Formvarianten aufweisen, wie die in der o.g. Publikation verwendeten COS7 Zellen. Abbildung 3.17 zeigt, daß alle Typen identifiziert werden konnten. Da die Morphologie der Organellen zwischen den einzelnen Zellen variiert, wurden anschließend die Formen aus jeweils 150 Zellen bestimmt. Die Bestimmung erfolgte blind, d.h. ohne die Kenntnis, ob es sich um Zellen handelte, die mit Sgk1 oder dem Kontrollplasmid kotransfiziert worden waren. Anschließend wurden die Mittelwerte aus den drei Parallelansätzen bestimmt und die Prozentzahlen für die fünf Formen ermittelt. Abbildung 3.18 zeigt, daß die Verteilung der verschiedenen Formen zwischen Sgk1-transfizierten Zellen und den Kontrollen kaum variiert. Die Überexpression von Sgk1 hat also keinen Einfluß auf die Mitochondrienmorphologie. Damit hat Sgk1 vermutlich keinen Einfluß auf die Teilung oder Fusion der Organellen.

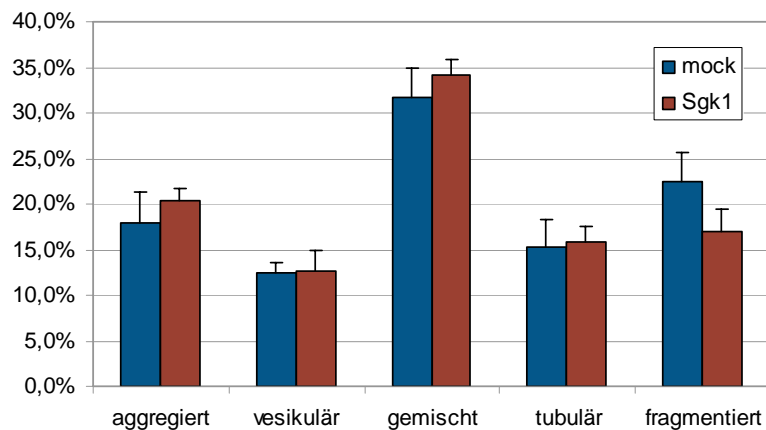


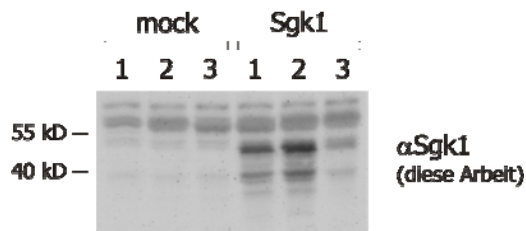
Abbildung 3.18 Die Überexpression von Sgk1 hat keinen Einfluß auf die Mitochondrienmorphologie
HEK293 Zellen wurden in je drei Parallelansätzen mit Sgk1 bzw. mit dem leeren Plasmid (mock) transfiziert. Die Morphologie der Mitochondrien wurde durch die Analyse der Fluoreszenzsignale des kotransfizierten Mitochondrienmarkers Mito-DsRed2 den fünf Formen zugeordnet. Aus jedem Transfektionsansatz wurden 150 Zellen ausgewertet, so daß insgesamt die Formen aus 450 Sgk1-transfizierten und 450 mock-transfizierten Zellen verglichen wurden. Die Formen sind jeweils in Prozent angegeben, zusätzlich in der Standardfehler eingezeichnet. Der t-Test ergab mit p-Werten $>0,25$ keine signifikanten Unterschiede.

3.8 Sgk1 hat keinen Einfluß auf die Transkription in HEK293 Zellen

Auch wenn eine nukleäre Lokalisation von Sgk1 in dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte, könnte Sgk1 in Analogie zu anderen Kinasen der AGC-Familie über die Modulation von Signaltransduktionswegen einen Einfluß auf die Expression bestimmter Gene haben. Durch die Identifikation solcher Gene könnten Rückschlüsse auf die zelluläre Funktion und spezifische Phosphorylierungstargets von Sgk1 gezogen werden.

3.8.1 Genchip-Analysen von Sgk1-transfizierten HEK293 Zellen

Um den Einfluß von Sgk1 auf die Genexpression zu untersuchen, wurde Sgk1 in HEK293 Zellen in drei Parallelansätzen durch Transfektion stark überexprimiert. Als Kontrolle wurden drei Transfektionen mit dem leeren Expressionplasmid pcDNA3.1(+) durchgeführt. Die Überexpression wurde durch Western Blot-Analysen eines Teils der Zellen überprüft (siehe Abbildung 3.19). Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen zur Analyse der genomweiten Genexpression mit Hilfe von Affymetrix Genchips des Typs *human genome U133 Plus 2.0* isoliert. Das Umschreiben der mRNA in cRNA, sowie die Hybridisierung und das Auslesen der Genchips wurden im Labor für Funktionelle Genomforschung der Charité Berlin durchgeführt. Die verwendeten Genchips der neusten Generation decken alle bekannten Gene ab und erlauben die Analyse des gesamten Transkriptom. Die Auswertung der Primärdaten mit dem Vergleich der Genexpression zwischen

**Abbildung 3.19****Kontroll-Western Blot nach den Transfektionen für die Genchip-Analysen**

HEK293 Zellen wurden in je drei Parallelansätzen mit Sgk1 oder dem leeren Plasmid (mock) transfiziert. Die Western Blot-Analysen zeigen, daß die Transfektion von Sgk1 in allen Ansätzen erfolgreich war.

Sgk1 transfizierten Zellen und Kontrollen, sowie die statistische Auswertung erfolgten durch eine von Dr. Nils Blüthgen entwickelte Software. Die Daten wurden schließlich nach der Wahrscheinlichkeit für eine durch die Transfektion von Sgk1 bedingte Genexpressionsveränderung sortiert. Tabelle 3.1 zeigt die 25 Gene mit der größten Wahrscheinlichkeit.

Der p-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, daß die Veränderungen falsch positiv sind. Bei der gesamten Analyse wurden insgesamt nur sieben Gene identifiziert, deren Veränderung größer ist als der Faktor 2. Sechs dieser Gene finden sich in der Tabelle 3.1. Das siebte Gen, Hint3 (*histidine triad nucleotide binding protein 3*), war mit drei sogenannten *probe sets* auf dem Chip vertreten und zeigte bei einem der *probe sets* eine Regulation um den Faktor 3.2. Die Veränderung wurde jedoch als statistisch unwahrscheinlich bewertet.

In der Tabelle ist eine Hochregulation der Genexpression nach Transfektion von Sgk1 im Vergleich zu den mock-transfizierten Zellen durch positive Veränderungswerte angegeben. Negative Werte (in rot) zeigen eine verringerte Expression an. Wie die Tabelle 3.1 zeigt, sind alle Gene mit einer mehr als zweifachen Veränderung der Expression bei den Sgk1-transfizierten Zellen herunterreguliert.

Tumornekrosefaktor α -induziertes Protein 3 (TNFAIP3) und Interleukin-8, die mit einem Veränderungsfaktor von >2 zu den stärker regulierten Genen dieser Analyse gehören, sind mit je zwei *probe sets* in der Tabelle vertreten. Bei den zweiten *probe sets* im unteren Teil der Tabelle wurden jedoch jeweils geringere Veränderungen detektiert.

Mit Pentraxin-3, Interleukin-8, Interleukin-32 und CCL20 (MIP-3 α) sind vier der Gene mit den stärksten Expressionsveränderungen sezernierte Proteine. Sie alle haben immunmodulatorische, oder genauer proinflammatorische Funktionen (Bottazzi *et al.*, 2006; Harada *et al.*, 1994; Joosten *et al.*, 2006; Rossi *et al.*, 1997).

Tabelle 3.1 Ergebnisse der Genchip-Analyse

Gen-Symbol (probe set)	Gen	p-Wert	Veränderung
CCL20 (205476_at)	MIP-3 α (<i>macrophage inflammatory protein 3α</i>)	0,00000	-6,431
IL8 (202859_x_at)	Interleukin-8	0,00000	-3,450
TNFAIP3 (202644_s_at)	Tumornekrosefaktor α -induziertes Protein 3	0,00001	-2,036
NFKBIA (201502_s_at)	I κ B α	0,00001	-1,838
SDC4 (202071_at)	Syndecan 4	0,00001	-1,493
TNFRSF9 (207536_s_at)	TNF receptor superfamily, member 9, Mitglied der TNF Rezeptor Superfamilie (CDw137)	0,00002	-2,819
PTX3 (206157_at)	Pentraxin 3	0,00002	-2,088
LOC93556 (1558411_at)	ORF auf Chromosom 3	0,00002	1,472
IL32 (203828_s_at)	Interleukin-32	0,00003	-2,505
CHD7 (222755_s_at)	Chromodomäne Helicase DNA bindendes Protein 7	0,00003	-1,479
JUNB (201473_at)	jun B Proto-Onkogen	0,00003	-1,567
IER3 (201631_s_at)	<i>immediate early response 3</i>	0,00003	-1,561
SMC4L1 (237246_at)	<i>structural maintenance of chromosome 4-like 1</i>	0,00005	1,515
KBTBD7 (229298_at)	<i>kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 7</i>	0,00007	1,548
THAP1 (219292_at)	<i>THAP domain containing, apoptosis associated protein 1</i>	0,00006	1,455
FLJ90709 (235241_at)	hypothetisches Protein	0,00006	1,430
TUSC3 (209227_at)	<i>tumor suppressor candidate 3</i>	0,00008	1,600
C11orf30 (219012_s_at)	ORF auf Chromosom 11	0,00009	1,395
IL8 (211506_s_at)	Interleukin-8	0,00012	-1,679
ELMOD2 (1553928_at)	ELMO/CED-12 Domäne enthaltendes Protein 2	0,00011	1,535
ARG99 (226322_at)	Transmembran- und Tetratricopeptidwiederholung-enthaltendes Protein	0,00011	1,481
WDR8 (236382_at)	WD-Repeat domäne 8	0,00011	-1,444
FLJ11011 (222657_s_at)	putatives Ubiquitin-konjugierendes Enzym	0,00012	1,386
TNFAIP3 (202643_s_at)	Tumornekrosefaktor α -induziertes Protein 3	0,00012	-1,377
SLC26A5 (238020_at)	Prestin (<i>solute carrier family 26, member 5</i>)	0,00013	1,435

3.8.2 Validierung der Genchip-Daten durch RT-PCR Analysen

Genchip-Untersuchungen sind als *screening*-Verfahren geeignet, um Veränderungen in der Gesamt-Genexpression zu identifizieren. Die gefundenen Daten müssen jedoch mit unabhängigen Methoden bestätigt werden. Dazu wurden in dieser Arbeit RT-PCR Analysen für vier der potenziell regulierten Gene durchgeführt: Das am stärksten regulierte Gen, CCL20 (MIP-3 α), kodiert für ein Chemokin, TNFAIP3 und I κ B α sind Inhibitoron des NF κ B-Transkriptionsfaktorkomplexes und TNFRSF9 ist ein Zelloberflächenprotein aus der Familie der TNF-Rezeptoren.

Es wurden jeweils sämtliche RNAs untersucht, die schon für die Genchip-Analysen verwendet wurden und zusätzlich RNAs aus je drei weiteren, unabhängigen Transfektionen mit Sgk1 bzw. dem leeren Expressionsplasmid. Abbildung 3.20 zeigt die Ergebnisse der RT-PCRs. Als Kontrolle für die reverse Transkription wurde als *house keeping*-Gen die Pyruvatdehydrogenase (PDH) amplifiziert. Um auszu-

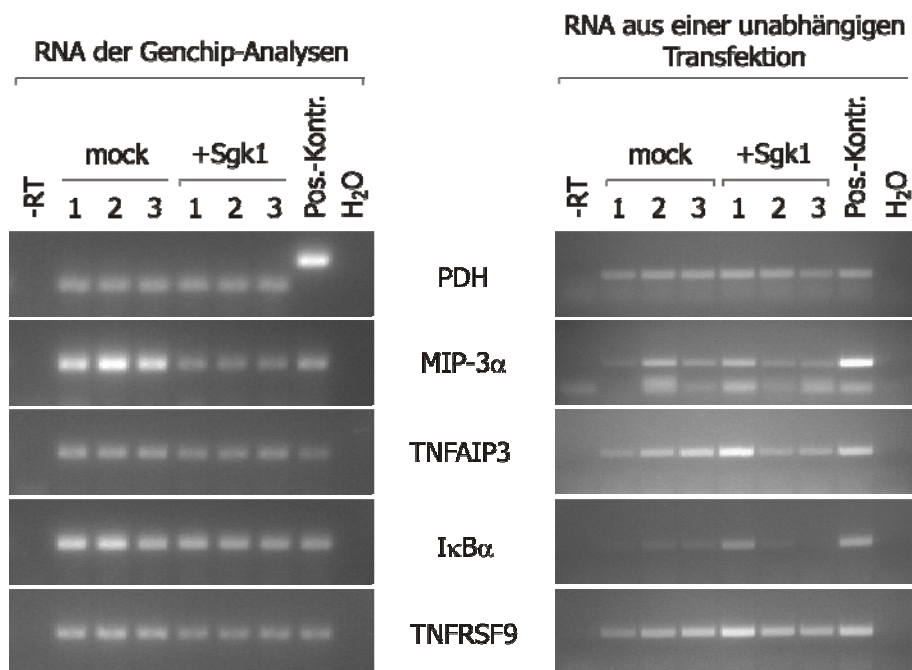


Abbildung 3.20 Untersuchung der Expression potenziell Sgk1-regulierter Gene durch RT-PCR RNAs, die bereits für die Genchip-Analysen verwendet wurden (links), sowie RNAs aus einem unabhängigen Transfektionsexperiment (rechts) wurde revers transkribiert und durch anschließende PCR-Reaktionen zum Nachweis der in der Mitte angegebenen Gene untersucht (PDH: Pyruvatdehydrogenase). Dabei wurden jeweils Sgk1-transfizierte (+Sgk1, 1-3) und mit dem leeren Expressionsplasmid transfizierte (mock, 1-3) HEK293 Zellen miteinander verglichen. Die verwendeten Primer und Reaktionsbedingungen sind der Tabelle 2.5 zu entnehmen. Als Negativ-Kontrollen für die PCR-Reaktionen wurden Wasser als Templat (H₂O), sowie ein Ansatz ohne vorherige reverse Transkription (-RT) eingesetzt. Als Positiv-Kontrolle (Pos.-Kontr.) für die PDH-PCR wurde in einem Fall genomische DNA eingesetzt (links oben). Die PDH-Primer sind so gewählt, daß sie aus genomischer DNA ein Intron mitamplifizieren, was zu einem größeren PCR-Produkt führt. Damit kann zusätzlich kontrolliert werden, das die cDNAs nicht mit genomischer DNA kontaminiert sind. Bei allen anderen PCR-Reaktionen wurde ein Mix aus verschiedenen cDNAs als Positiv-Kontrolle eingesetzt.

schließen, daß sich kontaminierende genomische DNA im Reaktionsansatz befindet, wurde einer der Ansätze ohne reverse Transkription durchgeführt. Darüberhinaus wird mit den PDH-Primern bei Kontaminationen mit genomischer DNA ein Intron mitamplifiziert.

Die Ergebnisse beider Ansätze zeigen ein gleichbleibend starkes Signal für PDH, so daß die Expression der untersuchten Gene miteinander verglichen werden kann. Die RT-PCRs aus den für die Genchip-Analysen verwendeten RNA-Proben bestätigen die Daten der *microarray*-Untersuchungen. In allen Sgk1-transfizierten Ansätzen ist die Expression von CCL20, TNFAIP3, I κ B α und TNFRSF9 geringer, als in den mit dem leeren Plasmid transfizierten Zellen. Wie die Genchip-Daten vermuten ließen, zeigte die CCL20-Expression dabei die größten Unterschiede. In den unabhängigen Kontrolltransfektionsansätzen ließ sich der Einfluß von Sgk1 auf die Transkription von CCL20, TNFAIP3, I κ B α und TNFRSF9 nicht bestätigen (Abbildung 3.20, links). Die Stärke der Genexpression schwankt zwischen den sechs Ansätzen, allerdings unabhängig von der Sgk1-Überexpression, die auch bei diesem Experiment parallel in einer Western Blot-Analyse bestätigt wurde. Interessanterweise läßt sich auch hier beobachten, daß die Expression der vier untersuchten Gene relativ gleichsinnig gesteuert ist.

Da durch die Genchip-Analysen nur sehr wenige Sgk1-regulierte Gene identifiziert wurden, und da sich die Regulation in einem unabhängigen Experiment nicht bestätigen ließ, ist es wahrscheinlich, daß Sgk1 keinen Einfluß auf die Kontrolle der Transkription von Genen hat.

3.9 NDRG1 ist ein Phosphorylierungstarget von Sgk1 im Hippocampus der Maus

Sgk1 wurde in der Arbeitsgruppe Kuhl erstmals als aktivitätsreguliertes Gen im Hippocampus der Ratte und der Maus beschrieben (siehe Kapitel 1.11). Obwohl einige publizierte Arbeiten Sgk1 mit einer Rolle bei Hippocampus-abhängigem Lernen in Verbindung bringen, muß der molekulare Wirkmechanismus von Sgk1 im Hippocampus als unbekannt angesehen werden. NDRG1 und NDRG2 sind die einzigen Proteine, die als Phosphorylierungstargets von Sgk1 unter Zuhilfenahme von Sgk1-/- Mäusen in Lunge, Leber, Milz und Skelettmuskulatur bestätigt werden konnten. (Murray *et al.*, 2004). Da Antikörper gegen NDRG1, sowie ein Phospho-spezifischer Antikörper gegen die von Sgk1 phosphorylierten Reste von NDRG1 zu Verfügung stand, konnte durch Western Blot-Analysen untersucht werden, ob die Phosphorylierung von NDRG1 auch im Hippocampus der Maus eine Rolle spielt. Wie durch Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe Kuhl bereits bekannt war, wird Sgk1 mRNA im Hippocampus sowohl durch Stress, als auch durch neuronale Aktivität hochreguliert. Dabei führt neuronale Aktivität zu einer vermehrten Expression v.a. in den Nervenzellen des Gyrus dentatus, wohingegen Stress hauptsächlich in einer oligodendrocytären Expression resultiert (Kauselmann, 1997; siehe Kapitel 1.11). Um die Phosphorylierung von NDRG1 sowohl nach stressbedingter als auch aktivitätsabhängiger Induktion von Sgk1 zu untersuchen, wurde männlichen Wildtyp- und Sgk1-/- Mäusen das synthetische Glukokortikoid Dexamethason, sowie der Glutamatrezeptoragonist Kainat appliziert. In ausreichender Dosis löst Kainat generalisierte tonisch-klonische Krampfanfälle aus und führt damit zu

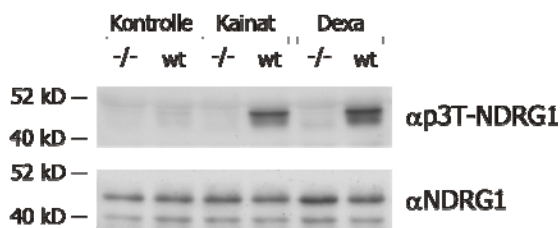


Abbildung 3.21 NDRG1 wird durch Sgk1 im Hippocampus nach neuronaler Aktivität und Gabe von Dexamethason phosphoryliert.

Wildtyp-Mäuse und Sgk1^{-/-} Mäuse wurden mit Dexamethason (Dexa) bzw. Kainat behandelt. 2 h nach der Dexamethason-Injektion, bzw. nach dem Auftreten von Krampfanfällen wurden die Hippocampi der Tiere präpariert und die Gewebelysate durch Western Blot-Analysen auf die Expression von NDRG1 (unten) und die Phosphorylierung von NDRG1 an den Resten T346, T356 und T366 (oben) untersucht. Zur Überprüfung der Phosphorylierung wurde ein phosphospezifischer Antikörper eingesetzt (αp3T-NDRG1).

einer überschießenden neuronalen Aktivität insbesondere im Hippocampus. Zwei Stunden nach der Behandlung mit Dexamethason, bzw. zwei Stunden nach dem Auftreten von Krampfanfällen wurden die Tiere getötet, die Hippocampi präpariert und Lysate der Gewebe hergestellt. Als Kontrollen wurden je eine unbehandelte Wildtyp- und Sgk1^{-/-} Maus mitgeführt. Die Western Blot-Analysen der Lysate zeigen, daß NDRG1 im Hippocampus exprimiert wird und daß die Expression von NDRG1 sich nach den Behandlungen nicht ändert. Die phosphorylierte Form läßt sich nur bei den Wildtyp-Tieren nachweisen, womit bestätigt wird, daß ausschließlich Sgk1 für die Phosphorylierung der Reste T346, T356 und T366 verantwortlich ist. Sowohl nach neuronaler Aktivität, als auch nach Dexamethason wird NDRG1 in Wildtyp-Mäusen stark phosphoryliert. Unter Kontrollbedingungen liegt NDRG1 kaum phosphoryliert vor (Abbildung 3.21).

Die Western Blot-Analysen zeigen, daß NDRG1 ein Phosphorylierungstarget von Sgk1 im Hippocampus ist. Sie erlauben jedoch keine Aussage über die räumliche Verteilung von NDRG1 im Hippocampus und über die Zellschichten, in denen NDRG1 durch Sgk1 phosphoryliert wird. Leider erwies sich der phosphospezifische Antikörper als nicht geeignet für den Einsatz in der Immunhistochemie, so daß ein *in situ*-Nachweis der NDRG1-Phosphorylierung nicht möglich war. Da auch der Nachweis des Sgk1-Proteins mit verschiedenen Antikörpern in Gewebeschnitten nicht gelang, wurde die räumliche Expression von Sgk1 und NDRG1 im Hippocampus sowohl nach neuronaler Aktivität, als auch nach Dexamethason-Gabe mit Hilfe von *in situ*-Hybridisierungen auf mRNA Ebene verglichen.

Zur Herstellung der Sonden wurde das komplette Leseraster von Sgk1 und der 3' untranslatierte Bereich von NDRG1 verwendet. Durch die Verwendung dieses cDNA-Abschnittes sollte verhindert werden, daß durch die NDRG1-Sonde auch andere Mitglieder der NDRG-Familie detektiert werden. Beide Sequenzabschnitte wurden in das Plasmid pBluescript II KS+ kloniert und je eine *sense*- und eine *antisense*-Sonde in Gegenwart von α³⁵S]UTP mit Hilfe der T7-, bzw. T3-Polymerase hergestellt.

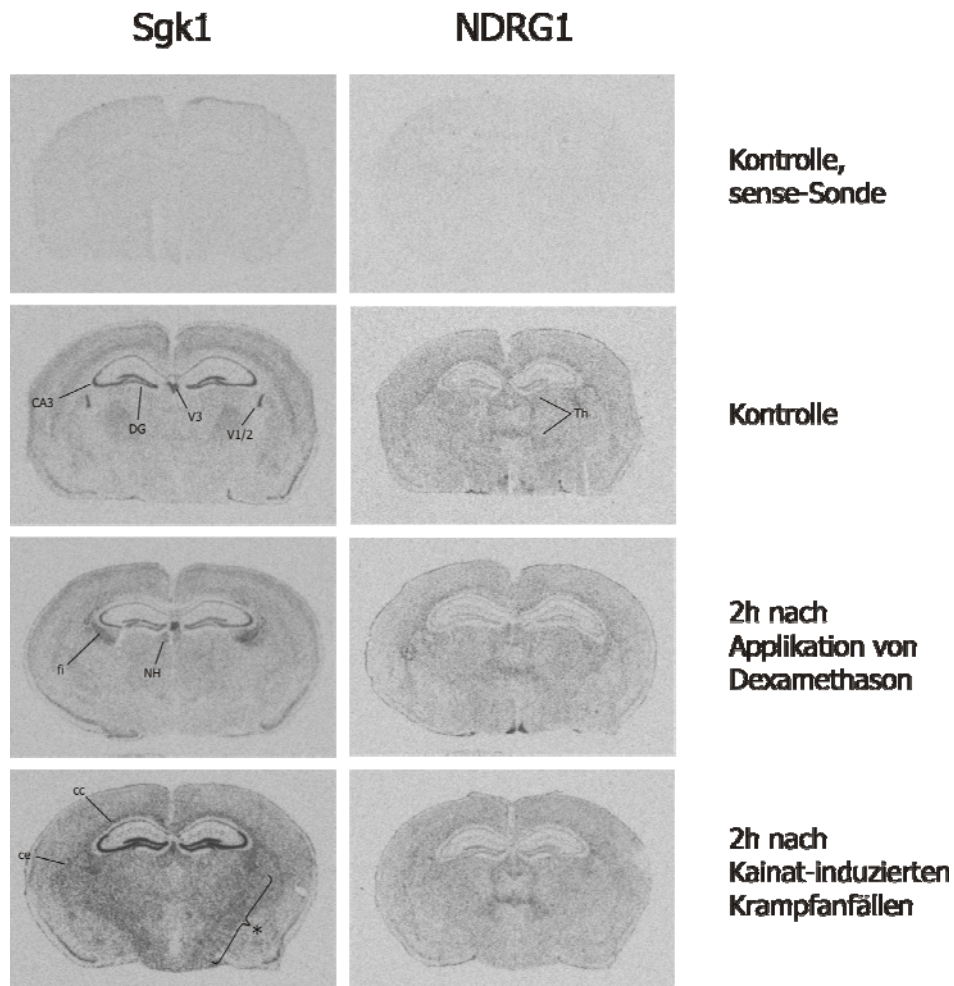


Abbildung 3.22 Räumliche Expression von Sgk1 und NDRG1 mRNA im Hippocampus der Maus.

Die räumliche Expression von Sgk1 und NDRG1 mRNA im Gehirn der Maus wurde durch *in situ*-Hybridisierung mit α [35 S]UTP-markierten RNA-Sonden auf coronalen Gefrierschnitten untersucht. Die oberen zwei Schnitte wurden jeweils mit *sense*-Sonden, alle anderen mit *antisense*-Sonden hybridisiert, und die Signale anschließend autoradiographisch detektiert. Alle Schnitte waren für zwei Tage einem Röntgenfilm exponiert. Die Sgk1 *antisense*-Hybridisierung zeigt eine basale Expression im Gyrus dentatus (DG), in der CA3-Region und im Bereich der Ventrikel 1-3 (V1-3). 2 h nach intraperitonealer Applikation von Dexamethason zeigen sich zusätzlich Signale im Bereich der Fimbrien (fi) und der Nuclei habenulares (NH). 2 h nach einem generalisierten Krampfanfall wird die stark erhöhte Sgk1-Expression in der CA3-Region und v.a. im Gyrus dentatus sichtbar. Darüberhinaus wurden vermehrt Signale im Bereich verschiedener Fasersysteme, wie dem Corpus callosum (cc) und der Capsule externa (ce) detektiert. Der * bezeichnet verschiedene Fasersysteme, die nicht exakt zugeordnet werden können. Hier befinden sich die Capsula interna, der Tractus opticus, das mediale Vorderhirnbündel und weiter caudal ein Teil des Pendunculus cerebellaris. Die Hybridisierung mit einer NDRG1 *antisense*-Sonde zeigt bei der Kontrolle, 2 h nach Krampfanfall und 2 h nach Dexamethasonbehandlung das gleiche Expressionsmuster. NDRG1 ist relativ schwach, aber gleichmäßig im ganzen Gehirn exprimiert. Ein leicht erhöhtes Expressionsniveau findet in den Thalamuskernen (Th), sowie im Corpus Callosum und in den Fimbrien des Hippocampus. Auch in den Neuronen des Hippocampus läßt sich die Expression von NDRG1 mRNA nachweisen.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.22 gezeigt. Die aktivitätsabhängige Induktion von Sgk1 zeigt das gleiche Muster wie in der Ratte mit einer verstärkten Expression im Gyrus dentatus und der CA3-Region des Hippocampus, sowie im Bereich verschiedener Faserbahnen. Zwei Stunden nach der Applikation des Glukokortikoidrezeptor-Agonisten Dexamethason zeigt sich zusätzlich zu der basalen Expression in den Hippocampusneuronen und in den Ventrikeln 1-3 eine erhöhte mRNA-Expression in den Fimbrien, die afferente und efferente Fasern des Hippocampus enthalten. Darüberhinaus sind verstärkte Signale in den Habenularkernen zu erkennen, die mit zahlreichen biologischen Funktionen, wie Schmerzverarbeitung, reproduktivem Verhalten, Steuerung des Schlaf-Wach-Rhythmus, Stressantwort und Lernvorgängen in Verbindung gebracht werden (Andres *et al.*, 1999). Die Signale aus den Ventrikeln sind auf Grund der Morphologie vermutlich auf eine Sgk1-Expression im Plexus choroideus zurückzuführen. Interessanterweise lassen sie sich nur unter basalen Bedingungen nachweisen.

Die relativ homogene NDRG1 mRNA-Expression im Gehirn verändert sich nach neuronaler Aktivität und nach Gabe von Dexamethason nicht im Vergleich zu unbehandelten Mäusen. Überschneidungen der Sgk1- und NDRG1-Signale ergeben sich sowohl im neuronalen Bereich, als auch in der weißen Substanz, wie z.B. den Fimbrien. Im Hippocampus wird NDRG1 hauptsächlich in der Körnerzellen, den Neuronen der CA1- und CA3-Region, sowie etwas schwächer im Stratum lacunosum moleculare exprimiert. Damit wird wahrscheinlich, daß eine Sgk1-abhängige Phosphorylierung von NDRG1 sowohl nach Gabe von Dexamethason, als auch nach neuronaler Aktivität in den hippocampalen Neuronen erfolgt.