

**Die Bedeutung von Annexin A2 bei der Translokation des  
Wasserkanals Aquaporin 2 im Sammelrohr der Niere**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Diplom-Biologin**

**HENRIETTE JOSEPHINE KAMINSKI**

aus Rüdersdorf

2012

Diese Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Sebastian Bachmann und unter der Betreuung von Dr. Alexander Paliege im Institut für Vegetative Anatomie an der Charité in Berlin in der Zeit vom November 2010 bis zum Dezember 2012 angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Bachmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Mutzel

Disputation am 21.03.2013

## **DANKSAGUNG**

Ich danke Dr. Alexander Paliege und Prof. Dr. Bachmann dafür, dass sie mich aufgefangen haben und mir die Möglichkeit gaben ein neues Projekt durchzuführen. Alex, vielen Dank für deine Betreuung und vor allem für deine positive Einstellung bei Misserfolgen.

Einen ganz lieben Dank an Kerstin für ihre immunhistologische-, an Frauke für ihre molekulargenetische, an John für seine elektronenmikroskopische- und an Elisabeth für ihre Unterstützung in der Zellkultur.

Christin, vielen Dank für deine Unterstützung und Einweisung in die Ko-Immunpräzipitation.

Vielen Dank an Dr. Enno Klussmann, PhD Frank Goetz, Dr. Philipp Skroblin und Dr. Marie Moutty aus der Arbeitsgemeinschaft Rosenthal / Klussmann am Max Delbrück Zentrum in Berlin Buch für die methodische Einarbeitung, Labornutzungsrechte und Finanzierung der Proteinaufreinigung und Peptid SPOT Arrays.

Vielen Dank an alle Doktoranden und Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Bachmann für die Anregungen zu experimentellen Setups, die gute Stimmung im Labor und die schönen Mittagspausen.

Ich danke meiner Familie und Hendrik, die mich bei Rückschlägen immer wieder aufgebaut, abgelenkt und ausgehalten haben.

Prof. Dr. Maik Gollasch danke ich für das Korrekturlesen der Dissertation

Ich danke dem Promotionsausschuss und allen, die zum erfolgreichen Abschluss dieser Dissertation beigetragen haben. Dabei gilt mein ganz besonderer Dank Dr. Sylvia Bähring, die vor allem durch ihre mentale Unterstützung aber auch durch konstruktives Korrekturlesen den unterstützenden Löwenanteil zur Entstehung dieser Dissertation geliefert hat.

Zum Schluss möchte ich der Charité für die finanzielle Unterstützung meiner Promotion, mithilfe eines zweijährigen Promotionsstipendiums danken.



## ZUSAMMENFASSUNG

Eine Hauptaufgabe der Niere ist die Regulation des Wasser-Salz-Haushaltes. Bei Wassermangel oder Hypernatriämie wird Vasopressin (AVP) ausgeschüttet. Es aktiviert V2-Rezeptoren und stimuliert dadurch die Konzentration des Urins in der Niere. Im Sammelrohr bewirkt die V2-Rezeptor-Signalkaskade eine erhöhte Expression und Translokation des Wasserkanals Aquaporin2 (AQP2) zur apikalen Plasmamembran. Über diesen Kanal wird Wasser aus dem Primärharn in das Interstitium rückresorbiert, um dann wieder den Blutgefäßen zugeführt zu werden. Störungen im AVP-System können sowohl Hypo- als auch Hypernatriämien verursachen. Brattleboro Ratten mit zentralem Diabetes insipidus werden verbreitet als Modellorganismus zur Untersuchung der V2-Rezeptor-Signalkaskade genutzt. Ihre Sammelrohrzellen besitzen zwar den zellulären Signaltransduktionsapparat für die AVP-vermittelte Translokation von AQP2, aufgrund ihres systemischen AVP-Mangels zeigen sie jedoch eine verminderte Expression von AQP2 an der apikalen Plasmamembran und 10-fach erhöhte Urinvolumina.

Die hier vorliegende Arbeit belegt eine direkte und spezifische Rolle des kalziumabhängigen Phospholipidbindepoteins ANXA2 und seines Bindungspartners P11 bei der Translokation von AQP2. Dabei liefert sie eine umfassende Lokalisationsstudie von ANXA2 in der Niere. Nach Aktivierung der V2-Rezeptor-Signalkaskade durch das AVP-Analogon dDAVP zeigt sie neben der Expressionssteigerung von AQP2 auch die erhöhte Expression von ANXA2 und liefert den ersten tierexperimentellen Nachweis der Ko-Translokation von AQP2, ANXA2 und P11. Sie bestätigt und verifiziert die Komplexierung von ANXA2 und AQP2, zeigt aber keine direkte Bindung zwischen den beiden Proteinen. Mittels *Peptid SPOT Arrays* belegt sie jedoch eine direkte Bindung zwischen P11 und dem C-Terminus von AQP2 und zeigte eine zusätzliche, direkte Bindung zwischen einem Tetramer, bestehend aus zwei ANXA2 und zwei P11 Molekülen, mit dem N-Terminus von AQP2. Diese Bindung ist abhängig vom Phosphostatus des ANXA2. Phosphomimetisches Aspartat anstelle von Serin 26 verhindert die Bindung, wobei phosphomimetisches Aspartat anstelle von Tyrosin 24 keinen Einfluss darauf hat. Die Ergebnisse dieser Studie liefern neue Bausteine zur Entschlüsselung der AVP-Signalkaskade, die im Zuge der Urinkonzentrierung aktiviert wird. Sie ist ein weiterer Schritt zur Entwicklung neuer Therapieansätze zur besseren Behandlung von AVP-induzierten Osmolaritätsstörungen.

## ABSTRACT

A major function of the kidney is the regulation of body water and electrolyte balance. In case of water deprivation or hypernatremia, vasopressin (AVP) is secreted to activate V2 receptors, and therefore stimulates the urinary concentrating mechanism in the kidney. The V2 receptor signaling cascade in the collecting duct leads to increased expression and translocation of the water channel AQP2 (aquaporin2) to the apical membrane. Water from inside the tubular system is reabsorbed by this channel to be delivered back to the vasculature. A disrupted AVP system leads to hyponatremia or hypernatremia. Brattleboro rats are broadly used as a model organism for the analysis of the V2 receptor signaling cascade. Though their collecting duct cells own the signaling transduction machine due to a mutation, they are not able to secrete AVP. Therefore, they show a reduced AQP2 expression at the apical membrane and tenfold increased urine volumes.

This dissertation reveals a direct and specific role of the calcium and phospholipid binding protein ANXA2 and its binding partner P11 in the translocation process of AQP2. It provides a widespread localization study of ANXA2 in the kidney. During activation of the V2 receptor signaling cascade via AVP analogon dDAVP it shows not only increased expressions of AQP2 but also of ANXA2. For the first time it proves the co-translocation of AQP2 ANXA2 and P11 in an animal model, under these circumstances. It also confirms the complexation of ANXA2 and AQP2 but does not find direct binding properties. However, using *Peptide SPOT Arrays* it demonstrates direct linkage among P11 and the C-terminal end of AQP2 and also an additional linkage among a tetramer composed of two ANXA2 and two P11 molecules and the N-terminal end of AQP2. This linkage is dependent on the phosphorylation status of ANXA2. A phospho-mimicking aspartate residue at the position of serine 26 prevents the binding, whereas a phospho-mimicking aspartate residue at the position of tyrosine 24 does not interfere. These results extend our knowledge regarding the intracellular signaling cascade involved in AVP-mediated urine concentration and may facilitate the development of novel mechanism-based pharmacological tools for the treatment of AVP-related diseases.

**INHALT**

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>II</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>III</b>
<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>VIII</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>X</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 ANATOMIE UND FUNKTION DER NIERE</b>	<b>2</b>
<b>1.2 DAS VASOPRESSIN- (AVP) SYSTEM</b>	<b>4</b>
<b>1.3 AVP INDUZIERTES TRAFFICKING VON AQP2 IM SAMMELROHR</b>	<b>6</b>
1.3.1 cAMP vermittelte Signalkaskade	6
1.3.2 Rolle des Zytoskeletts	6
1.3.3 Rolle der intrazellulären Kalziumoszillation	8
<b>1.4 ANXA2 UND P11</b>	<b>8</b>
1.4.1 ANXA2 - ein Mitglied der Annexin Familie	8
1.4.2 P11 (S100A10) – ein Mitglied der S100 Familie	10
1.4.3 ANXA2-P11-Tetramer – Transportfunktion	11
1.4.4 Regulation des Transports	12
1.4.4.1 Regulation des Transports durch Kalzium	13
1.4.4.2 Regulation des Transports durch Phosphorylierung	13
<b>1.5 DIE BRATTLEBORO RATTE ALS TIERMODELL FÜR DEN ZENTRALEN DIABETES INSIPIDUS</b>	<b>15</b>
<b>1.6 ZIELE</b>	<b>16</b>

<b>2.</b>	<b>MATERIALIEN</b>	<b>17</b>
2.1	ANTIKÖRPER	17
2.2	CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	17
2.3	RESTRIKTIONSENZYME	18
2.4	GERÄTE	19
2.5	KITS	20
2.6	KOMPETENTE <i>E. COLI</i> BAKTERIEN	20
2.7	SOFTWARE	20
2.8	SONDEN, PRIMER, VEKTOREN	21
2.9	VERBRAUCHSMATERIALIEN	21
<b>3.</b>	<b>METHODEN</b>	<b>23</b>
<b>3.1</b>	<b>TIEREXPERIMENTE</b>	<b>23</b>
3.1.1	Versuchstiere und Behandlung	23
3.1.1.1	Brattleboro Ratten	23
<b>3.2</b>	<b>PROTEINANALYTISCHE METHODEN</b>	<b>23</b>
3.2.1	Immunhistologie und Immunzytologie	23
3.2.1.1	Herstellung von Kryostatschnitten	23
3.2.1.2	Herstellung von Paraffinschnitten	24
3.2.1.3	Färbung von Immunhistologischen Präparaten	24
3.2.2	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	25
3.2.2.1	Herstellung von Ultra-Kryo Schnitten	25
3.2.2.2	Immungoldmarkierung von Ultra-Kryo Schnitten	26
3.2.3	Herstellung von Nierenlysaten aus Ratten für Ko- Immunpräzipitationen	26
3.2.4	Ko-Immunpräzipitation	27
3.2.5	Expression von rekombinanten Proteinen	27
3.2.6	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	29
3.2.6.1	Affinitätschromatographie im Batch-Verfahren	29
3.2.6.2	<i>High Pressure Liquid Chromatographie</i> (HPLC)	30
3.2.7	Peptid SPOT Array	31



3.2.7.1	Herstellung von Peptid SPOTs	31
3.2.7.2	Bindungsstudien: rekombinante Proteine und Peptid SPOT Array	32
3.2.8	Natrium-Dodecyl-Sulfat-Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	33
3.2.9	Westernblot (Immunblot)	34
3.2.10	Coomassie-Brillant-Blau Färbung	35
<b>3.3</b>	<b>MOLEKULARGENETISCHE METHODEN</b>	<b>36</b>
3.3.1	Genexpressionsanalyse	36
3.3.1.1	RNA Extraktion mittels Säulenaufreinigung	36
3.3.1.2	cDNA Synthese	36
3.3.1.3	Quantitative Realtime PCR mit TaqMan Sonden	37
3.3.2	Klonierung und Vektorwahl	39
3.3.2.1	Primerdesign	40
3.3.2.2	PCR (Polymerase-Chain-Reaction)	42
3.3.2.3	Overlap-Extension-PCR zur zielgerichteten Mutagenese	43
3.3.2.4	Agarose-Gelelektrophorese	44
3.3.2.5	Gelextraktion von PCR Produkten	45
3.3.2.6	Restriktionsverdau von Plasmiden und PCR Produkten	45
3.3.2.7	Ligation von Plasmiden und PCR Produkten	46
<b>3.4</b>	<b>MIKROBIOLOGISCHE METHODEN</b>	<b>46</b>
3.4.1	Herstellung kompetenter E.coli Stämme	46
3.4.2	Transformation von kompetenten Bakterien mit rekombinanten Plasmiden	46
3.4.3	Plasmid Präparation	47
<b>3.5</b>	<b>STATISTIK</b>	<b>47</b>
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>49</b>
<b>4.1</b>	<b>ANXA2 LOKALISATION IN DER NIERE</b>	<b>49</b>
4.1.1	ANXA2 Lokalisation in renalen Gefäßen	49
4.1.2	ANXA2 Lokalisation in renalen Tubulusabschnitten	51
4.1.3	ANXA2 Expression in renalen Tubulusabschnitten	52

## Inhaltsverzeichnis

4.1.4	Zusammenfassung der ANXA2 Distribution in renalen Tubulusabschnitten	53
<b>4.2</b>	<b>MODELLORGANISMUS BRATTLEBORO RATTE</b>	<b>55</b>
4.2.1	ANXA2 Lokalisation in renalen Tubulusabschnitten der Brattleboro Ratte	56
4.2.2	ANXA2 Expression in der inneren Medulla von dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten	58
<b>4.3</b>	<b>TRANSLOKATION VON ANXA2 IM SAMMELROHR VON dDAVP- BEHANDELTEN BRATTLEBORO RATTEN</b>	<b>59</b>
<b>4.4</b>	<b>PROTEIN-PROTEIN INTERAKTION</b>	<b>62</b>
4.4.1	Interaktion zwischen ANXA2 und AQP2	64
4.4.2	Interaktion zwischen phospho-ANXA2 und AQP2	67
4.4.3	P11 Translokation im Sammelrohr von dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten	68
4.4.4	Interaktion zwischen P11, ANXA2 und AQP2	69
<b>4.5</b>	<b>VERIFIKATION UND BEWERTUNG DER PROTEIN-PROTEIN INTERAKTION</b>	<b>72</b>
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>74</b>
	ANXA2-Lokalisation in renalen Strukturen	74
	Beziehung zwischen AQP2- und ANXA2-Expression	75
	ANXA2 und P11 sind <i>in vivo</i> am Translokationsprozess von AQP2 beteiligt	76
	Das ANXA2-P11-Tetramer und P11 binden direkt an AQP2	76
	Der Phosphostatus von ANXA2 spielt eine Rolle bei der Interaktion mit AQP2	78
	Spekulationen zur Rolle von ANXA2 bei der Translokation von AQP2	80
	Ausblick	83
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>85</b>

- 7. PUBLIKATIONEN, KONGRESSBEITRÄGE UND  
AUSZEICHNUNGEN** Fehler! Textmarke nicht definiert.
- 8. LEBENSLAUF** Fehler! Textmarke nicht definiert.

## Abkürzungen

### ABKÜRZUNGEN

ANXA2_S26D	rekombinant hergestelltes ANXA2 Protein mit phosphomimetischem Austausch des Serins durch Asparaginsäure an Stelle 26
ANXA2_Y24D	rekombinant hergestelltes ANXA2 Protein mit phosphomimetischem Austausch des Tyrosins durch Asparaginsäure an Stelle 24
AS	Aminosäuren
AVP	Arginin-Vasopressin
ASIC1a	<i>Acid-sensing ion channel 1a</i>
CDS	<i>coding sequence</i> - kodierende Sequenz
CRE	<i>cAMP-response-element</i>
c-Src	<i>cellular</i> und <i>sarcoma</i> Tyrosinkinase
D	Asparaginsäure
dDAVP	1-Desamino-8D-Arginin-Vasopressin (Desmopressin)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ds	doppelsträngig
Fwd	<i>Forward</i>
F	Phenylalanin
GST	Glutathion-S-Transferase
IgG	Immunglobulin
IM	innere Medulla
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-beta-D- thiogalactosid
kB	Kilobasen
mercapto	beta-merkaptoethanol
Nav 1.8	spannungsgesteuerter Natriumkanal 1.8
NKCC2	Natrium-Kalium-2Chlorid-Kotransporter
OM	<i>outer medulla</i> - äußere Medulla
PBS	<i>Phospho-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase-chain-reaction</i>
PGE2	Prostaglandin E2
phospho-ANXA2_Y24	ANXA2 mit Phosphatrest am Tyrosin 24
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RE	Restriktionsenzym
VIII	

Rev	<i>Reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S12	Aminosäure 12 ist ein Serin
S26	Aminosäure 26 ist ein Serin
ss	<i>single stranded</i> - einzelsträngig
TBST	<i>Tris buffered saline</i> mit 0,5-Tween
TRPV5	<i>Transient receptor potential cation channel subfamily V member 5</i>
TRPV6	<i>Transient receptor potential cation channel subfamily V member 6</i>
ü.N.	über Nacht
UT-A1	Ureatransporter A1
UT-A3	Ureatransporter A3
UTR	<i>untranslated region</i>
WT	Wildtyp
X	steht für eine beliebige Aminosäure
Y24	Aminosäure 24 ist ein Tyrosin
5-HT1B	<i>5-hydroxytryptamine receptor 1B</i>

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.	Anatomie und Mikroanatomie der Niere	3
Abb. 2.	Urinkonzentrierungsmechanismus	5
Abb. 3.	AVP Signaltransduktion, AQP2 Trafficking und transzellulärer Wassertransfer	7
Abb. 4.	Kristallstruktur der Kernregion von Annexinen am Beispiel von Annexin I	9
Abb. 5.	ANXA2-P11-Tetramer	10
Abb. 6.	Varianten der Membranbindung von ANXA2-P11-Tetramer	12
Abb. 7.	ANXA2-P11-Heterotetramer mit Phosphorylierungsstellen	14
Abb. 8.	Schematische Darstellung der indirekten Methode der Proteinlokalisierung mittels Immunfluoreszenz	24
Abb. 9.	IPTG abhängige Induktion von Strukturproteinen unter dem tac Operon	28
Abb. 10.	affinitätschromatische Auftrennung von GST-Fusionsproteinen.	30
Abb. 11.	Interaktion von Peptidomänen mit Protein und immunchemischer Nachweis.	31
Abb. 12.	Schematische Darstellung eines denaturierten Proteins, umlagert von SDS Molekülen.	33
Abb. 13.	Chemilumineszenz-Reaktion	35
Abb. 14.	Schematische Darstellung der Reversen-Transkriptase-PCR	37
Abb. 15.	Ablauf der Realtime PCR	38
Abb. 16.	Extinktionsbereiche der Farbstoffe FAM, VIC und TAMRA	39
Abb. 17.	pGEX-6P-1 Vektor mit integriertem ANXA2	40
Abb. 18.	Darstellung der <i>Primer</i> -Sequenzen für die Expression der Fusionsproteine ANXA2-GST und P11-GST	41
Abb. 19.	Darstellung der <i>Mutations-Primer</i> für die Expression der Fusionsproteine ANXA2_Y24D-GST und ANXA2_S26D	42
Abb. 20.	Schematische Darstellung der <i>Overlap-Extension</i> -PCR	44
Abb. 21.	Lokalisation von ANXA2 in renalen Gefäßen	50
Abb. 22.	Schematische Übersicht von ANXA2 in renalen Gefäßen	50
Abb. 23.	Lokalisation von ANXA2 in renalen Tubulusabschnitten	52
Abb. 24.	Lokalisation von ANXA2 in renalen Tubulusabschnitten	52
Abb. 25.	Schematische Übersicht von ANXA2 in renalen Tubulusabschnitten	54
Abb. 26.	Urinexkretion der Brattleboro Ratte	55
Abb. 27.	AQP2 Expression von dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten	56
Abb. 28.	Lokalisation von ANXA2 in der Niere von Brattleboro Ratten	57
Abb. 29.	ANXA2 Expression in der inneren Medulla von dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten	58

Abb. 30.	Proteinexpression und Lokalisation von ANXA2 in der inneren Medulla von dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten	59
Abb. 31.	ANXA2 Translokation im Sammelrohr von dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten - Immunhistologie	60
Abb. 32.	ANXA2 Translokation im Sammelrohr von dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten – Elektronenmikroskopie	61
Abb. 33.	Aufteilung der zytosolischen Domänen von AQP2 in 10 Peptide	63
Abb. 34.	Antikörpertest auf synthetisch hergestellten Proteinen	64
Abb. 35.	Ko-Immunpräzipitation von AQP2 und ANXA2	65
Abb. 36.	Ko-Immunpräzipitation von ANXA2 und AQP2	66
Abb. 37.	Peptid SPOT Array mit AQP2 Bibliothek und ANXA2 Protein	66
Abb. 38.	Ko-Immunpräzipitation von AQP2 und phospho-ANXA2	67
Abb. 39.	Peptid SPOT Array mit AQP2 Bibliothek und ANXA2_Y24D sowie ANXA2_S26D Protein	68
Abb. 40.	Ko-Translokation von P11 und ANXA2 im Sammelrohr von dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten	69
Abb. 41.	Peptid SPOT Array mit AQP2 Bibliothek und P11 Protein	70
Abb. 42.	Peptid SPOT Array mit AQP2 Bibliothek und ANXA2-P11-Tetramer	71
Abb. 43.	Hemmung der Ko-Immunpräzipitation von ANXA2 und AQP2 mit inhibitorischem AQP2-Peptid 1	72
Abb. 44.	Schematische Darstellung der direkten Interaktion zwischen AQP2 und P11 bzw. AQP2 und ANXA2-P11-Tetramer	78
Abb. 45.	Schematische Darstellung der Interaktion zwischen AQP2 und phospho-ANXA2-P11-Tetramer	79
Abb. 46.	Spekulationen zur Rolle von ANXA2 bei der Translokation von AQP2	83





## 1. EINLEITUNG

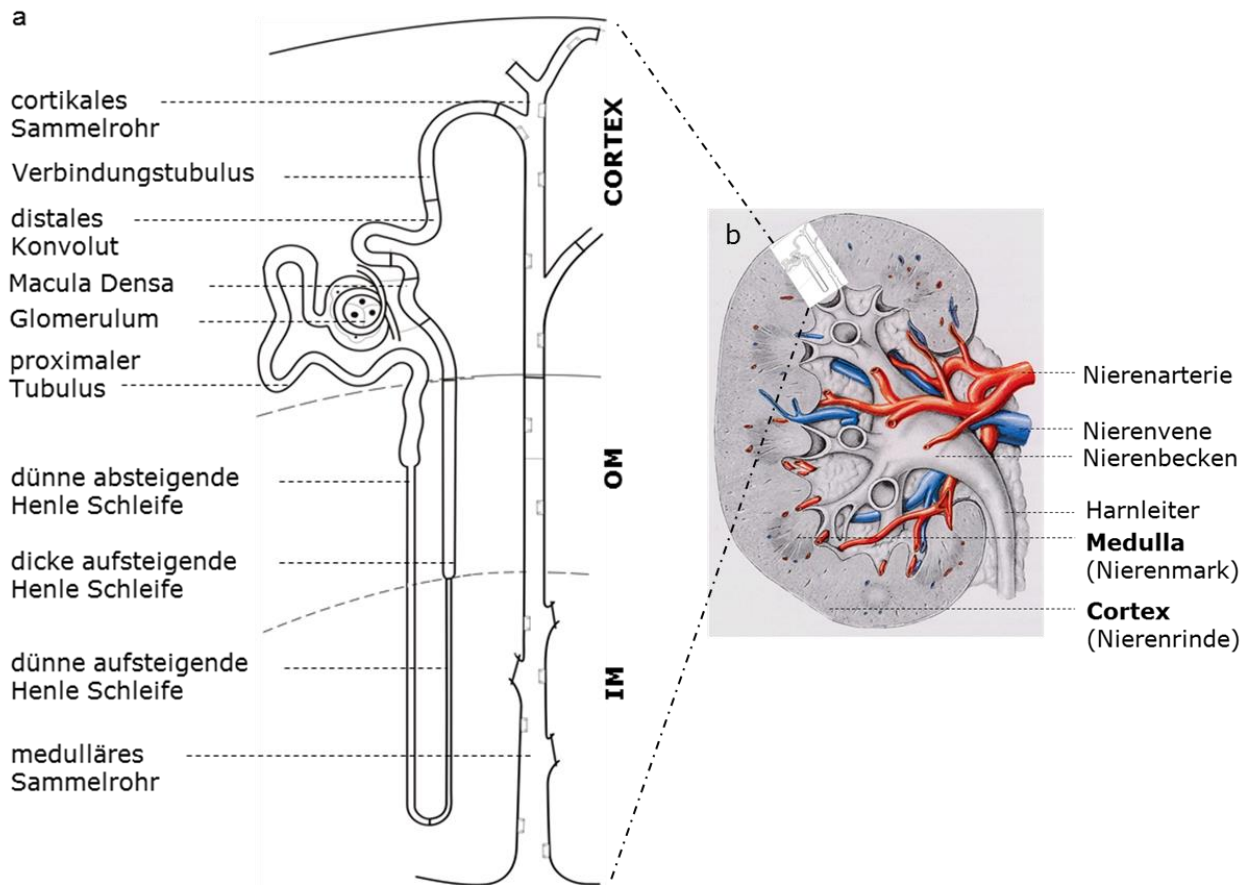
Die Niere reguliert unter anderem den Elektrolyt- und Wasserhaushalt. Wassermangel oder Hyponatriämie wird von Osmorezeptoren im Hypothalamus registriert. Die Folge ist ein Durstgefühl und das verstärkte Ausschütten von Vasopressin (AVP). AVP bindet in der Niere an V2-Rezeptoren und initiiert somit die Konzentration des Urins. Im Sammelrohr wird hierbei eine Signalkaskade aktiviert, die den Wasserkanal, AQP2, in die apikale Plasmamembran transportiert. Defekte im AVP-System können Osmolaritätsstörungen mit der Folge von Hyper- bzw. Hyponatriämie verursachen. Beim Diabetes insipidus sind Harnausscheidungen von 5 bis 25 Litern pro Tag und ein damit einhergehendes starkes Durstgefühl üblich. Ist die zentrale Ausschüttung von AVP gestört (zentraler Diabetes insipidus), wird Desmopressin, ein synthetisches AVP-Analogon, verabreicht. Es besitzt eine höhere Wirkdauer als AVP und wird deshalb nur zweimal am Tag appliziert. Für Störungen in der noch nicht vollständig aufgeklärten Signalkaskade im Sammelrohr (nephrogener Diabetes insipidus) existiert gegenwärtig, außer der ausreichenden Zufuhr von Flüssigkeit, keine adäquate Medikation.

Die Signalkaskade dient hauptsächlich dem Transport von AQP2-tragenden Vesikeln aus zytosolischen Speicherkompartimenten zur apikalen Plasmamembran. Der exakte Mechanismus dieses Transportes ist noch nicht vollständig geklärt. ANXA2, welches kalziumabhängig an Phospholipide bindet, ist als Vesikeltransporter in verschiedenen Endo- und Exozytoseprozessen involviert [1-5] und für die Translokation einer kleinen Auswahl von Kanalproteinen unentbehrlich [6-10]. ANXA2 wurde auch im Multiproteinkomplex um AQP2 detektiert und ist hier für die apikale Translokation von AQP2 essentiell [11, 12].

Diese Arbeit charakterisiert die Rolle von ANXA2 im Translokationsprozess von AQP2.

## **1.1 ANATOMIE UND FUNKTION DER NIERE IM ELEKTROLYT- UND WASSERHAUSHALT**

Neben der Ausscheidung von harnpflichtigen Substanzen, der Steuerung des Säure-Basenhaushaltes und der langfristigen Einstellung des Blutdruckes reguliert die Niere den Elektrolyt- und Wasserhaushalt. Dazu filtert sie das gesamte Blut zirka 30-mal am Tag. Das Blut gelangt über die Nierenarterie in die Niere und wird dem Körper über die Nierenvene gefiltert zurückgeführt. Die abgetrennten Bestandteile verlassen die Niere als Harn durch den Harnleiter (Abb. 1b). Die Niere wird in einen Rinden- und einen Markbereich eingeteilt. Die Grenze zwischen diesen Bereichen richtet sich nach den einzelnen Abschnitten der Nephrone, der kleinsten funktionellen Einheit der Niere (Abb. 1a). Jeder Mensch besitzt zwischen 331 000 und 1 000 000 davon pro Niere [13]. Das Nephron besteht aus dem Nierenkörperchen und dem Nierenkanälchen. Im Nierenkörperchen wird das Blut gefiltert, wobei Bestandteile, die größer als 70 kDa sind, die Blut-Harn Schranke nicht passieren können [14]. Im Tubulussystem des Nierenkanälchens wird der Primärharn durch Resorptions- und Sekretionsvorgänge in Endharn umgewandelt. Dabei passiert er den proximalen Tubulus, die dünne absteigende Henle Schleife, die dünne aufsteigende Henle Schleife, die dicke aufsteigende Henle Schleife, die Makula Densa, das distale Konvolut, den Verbindungstubulus und das kortikale sowie medulläre Sammelrohr in der angegebenen Reihenfolge (Abb. 1a). Der Endharn verlässt die Niere über das Nierenbecken und den Harnleiter. Der Wasser- und Elektrolythaushalt wird durch Ausscheidung oder Retention von Elektrolyten eingestellt. Natrium ist der häufigste Elektrolyt im Extrazellulärraum und bestimmt somit in erster Linie das Extrazellulärvolumen. Seine Konzentration wird von den Nieren konstant gehalten. Das heißt, erhöhte Zufuhr wird durch erhöhte Ausscheidung ausgeglichen und Mangel durch verminderte Ausscheidung kompensiert. Störungen des Salz-Wasserhaushaltes sind häufig und mit erheblicher Morbidität und Mortalität verbunden. Der Pathomechanismus dieser Störungen beinhaltet eine Dysregulation des AVP-Systems.



**Abb. 1. Anatomie und Mikroanatomie der Niere**

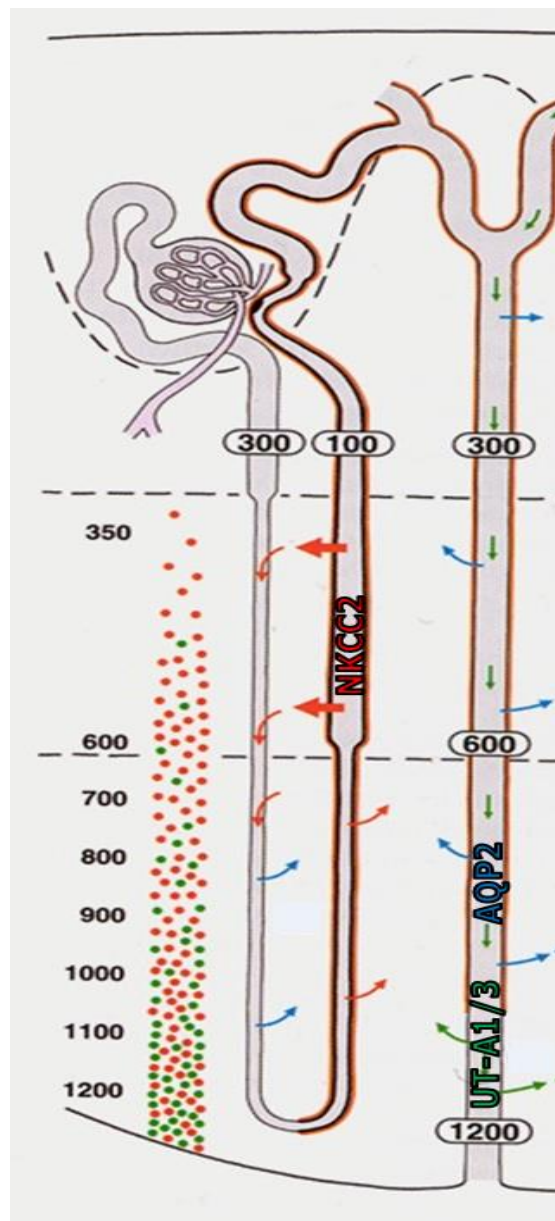
Abbildung a zeigt die Mikroanatomie eines Nephrons, der kleinsten funktionellen Einheit der Niere. Die Lage der einzelnen Nephron Abschnitte bestimmt die Aufteilung der Niere in Cortex, äußere und innere Medulla. Abbildung b zeigt die Anatomie einer Niere mit zuführender Arterie, abführender Vene und Harnleiter. Die Aufteilung in Cortex und Medulla ist gekennzeichnet. OM: äußere Medulla, IM: innere Medulla  
 Abbildung a ist von Kriz und Bankir [15], Abbildung b aus dem Anatomielehrbuch Benninghoff [16] übernommen.

## 1.2 DAS AVP - SYSTEM

Wassermangel oder Hypernatriämie werden von Osmorezeptoren im Hypothalamus registriert. Die Folgen sind ein Durstgefühl und die verstärkte Ausschüttung von AVP. AVP ist ein Peptidhormon, das als Präprohormon im Hypothalamus gebildet und bis zu seiner Ausschüttung in Vesikeln der Neurohypophyse gespeichert wird. AVP besitzt zwei Wirkungsorte für die Salz-Wasserregulation und die damit verbundene Blutdruckregulation. Bei Volumenmangel führt die Bindung an V1a-Rezeptoren in peripheren Gefäßen zur Erhöhung des Blutdrucks. Die Bindung an V2-Rezeptoren in der Niere führt zur Retention von Wasser und demzufolge zur Konzentrierung des Urins.

Der Urinkonzentrationsmechanismus findet hauptsächlich in den Nephronabschnitten dicke aufsteigende Henle Schleife und medulläres Sammelrohr statt. Diese Abschnitte exprimieren den V2-Rezeptor [17] und mindestens vier AVP regulierbare Transporter. Der Natrium-Kalium-2Chlorid-Kotransporter (NKCC2) wird von der dicken aufsteigenden Henle Schleife, der Wasserkanal (AQP2) von den Hauptzellen des Sammelrohrs und die beiden Harnstofftransporter (UT-A1 und UT-A3) von den Hauptzellen des terminalen Sammelrohrs exprimiert [18-25]. Die Aktivierung der V2-Rezeptoren führt zur Aktivierung und Einbau dieser Kanäle in die apikale bzw. basolaterale Plasmamembran [25-27]. In Abbildung 2 sind die Grundzüge des Urinkonzentrationsmechanismus dargestellt. NaCl wird verstärkt über den aktivierten NKCC in der dicken aufsteigenden Henle Schleife aus dem Tubuluslumen in das Interstitium transportiert. Da dieser Abschnitt wasserundurchlässig ist, wird das Interstitium osmotisch aufgeladen. Das führt zum Wassereinstrom aus der dünnen absteigenden Henle Schleife. Aufgrund der engen räumlichen Beziehung und des spezifischen Wandaufbaus der Haarnadelschleife wird so mittels Gegenstromprinzip ein osmotischer Gradient entlang der Längsachse der Niere aufgebaut. Im Cortex liegt die Osmolalität bei 300 mOsm/l, ähnlich der des Blutes. In der inneren Medulla kann sie bis zu 1200 mOsmol/l ansteigen. Harnstoff, welcher über die Harnstofftransporter UT-A1 und UT-A3 aus dem Sammelrohr in das Interstitium transportiert wird, trägt erheblich zum Aufbau des Gradienten bei [28, 29]. Wasser kann deshalb durch den AQP2-Kanal aus dem Tubuluslumen in das Interstitium und weiter in Blutgefäße rückresorbiert werden [20]. So wird der Urin bei Wassermangel bis auf ein

Vierfaches der Plasmaosmolalität aufkonzentriert (von 300 mosmol/l auf bis zu 1200 mosmol/l).



### Abb. 2. Urinkonzentrierungsmechanismus

Die Grafik zeigt die Grundlagen des Urinkonzentrierungsmechanismus. Alle vier dargestellten Kanäle werden durch AVP aktiviert. NaCl (rot) wird hauptsächlich über den NKCC2 Transporter aus dem Tubuluslumen ins Interstitium transportiert. Für Wasser (blau) ist dieser Nephronabschnitt undurchlässig. Der Ausgleich des durch NaCl angereicherten Interstitiums erfolgt durch Wassereinstrom aus der dünnen absteigenden Henle Schleife. Durch die enge räumliche Beziehung und den spezifischen Wandaufbau der Haarnadelschleife, wird mittels Gegenstromprinzip ein osmotischer Gradient aufgebaut. Im Cortex ist die Osmolalität ähnlich der des Blutes. Bis zur inneren Medulla steigt sie bis zu 1200 mOsmol/l. Harnstoff (grün) trägt maßgeblich zum Aufbau des osmotischen Gradienten bei. Es verlässt das Tubuluslumen am Ende des Sammelrohrs. So kann Wasser über AQP2 aus dem Tubuluslumen in das Interstitium rückresorbiert werden. Durch die Aufnahme in Blutgefäße wird es mit im Körper verteilt und der Urin auf bis zu 1200 mOsmol/l aufkonzentriert.

Die Abbildung wurde aus dem Lehrbuch Benninghoff [16] übernommen.

### **1.3 AVP INDUZIERTER TRANSLOKATION VON AQP2 IM SAMMELROHR**

Die Bindung von AVP an den V2-Rezeptor im Sammelrohr bewirkt eine Translokation von AQP2 zur apikalen Plasmamembran. Ist dieser Transport gestört, kann keine Urinkonzentration stattfinden. Es entsteht die Erkrankung des Diabetes insipidus. Bisher sind mindestens drei verschiedene Regulationsmechanismen bekannt, die an diesem Transport beteiligt sind.

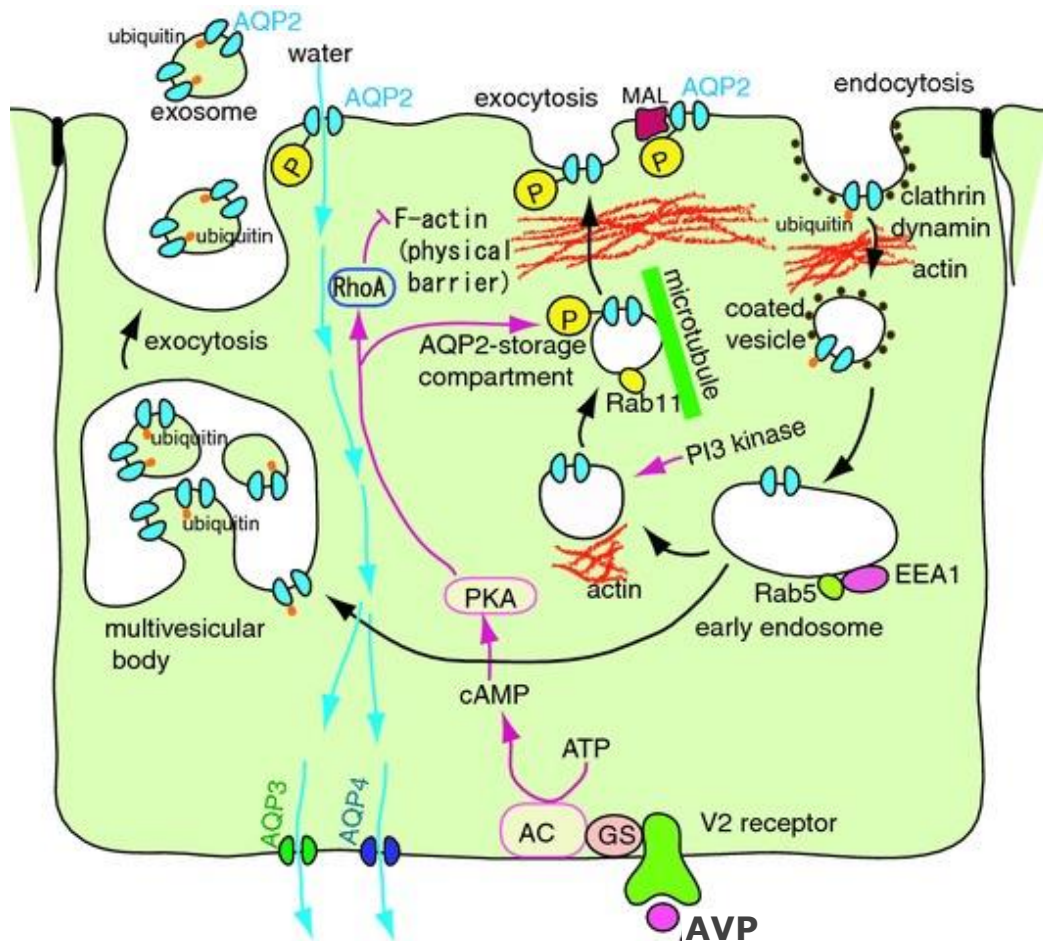
#### **1.3.1 cAMP vermittelte Signalkaskade**

AQP2 wird nach der Synthese in exozytotische Vesikel verpackt und in Rab11 positive Recyclingendosomen im apikalen Zytoplasma von ruhenden Sammelrohrzellen gespeichert [30, 31]. Die Bindung von AVP an V2-Rezeptoren stimuliert das G Protein  $G_{\alpha s}$ , welches die Adenylatcyclase 6 aktiviert (Abb. 3). Diese katalysiert die Bildung von cAMP. Die erhöhten cAMP Spiegel aktivieren die Proteinkinase A (PKA), die unter anderem AQP2 phosphoryliert [32-34]. Diese Phosphorylierung ist essentiell für die Fusion von AQP2-tragenden Vesikeln mit der apikalen Plasmamembran. Erst wenn drei Proteine des Homotetramers phosphoryliert sind, findet der Einbau des Wasserkanals in die Membran statt. Wasser fließt entlang des osmotischen Gradienten aus dem Urin durch die Zelle in das umliegende Interstitium und die Gefäße. Der Eintritt in die Sammelrohrzelle wird über AQP2, der Austritt über AQP3 und AQP4 gewährleistet. Der Abbruch des AVP Stimulus führt zur sofortigen Clathrin-vermittelten Endozytose von AQP2 in frühe, *Early endosome antigen 1* (EEA1)-positive, Endosomen. Anschließend wird AQP2 zurück in die Recyclingendosomen transferiert. Eine Teilmenge von AQP2 wird ubiquitiniert und durch Exozytose mit dem Urin ausgeschieden [35].

#### **1.3.2 Reorganisation des Zytoskeletts**

Zielgerichtete Transporte werden durch spezifische Transportproteine entlang des Zytoskeletts gesteuert. Der Transport von AQP2-tragenden Vesikeln bis zum Speicherkompartiment im apikalen Zytosol wird von Mikrotubuli zusammen mit den Motorproteinen Dynein und Dynactin arrangiert [36-38]. Das Netzwerk aus Aktinfilamenten im Randbereich der Sammelrohrzellen verankert die AQP2-tragenden Vesikel im Ruhezustand. Wird jedoch die PKA durch die Signalkaskade

aktiviert, phosphoryliert sie den Aktinzytoskelettregulator, RhoA, der dadurch inaktiviert wird. Das führt zur Depolymerisierung des Netzwerkes aus Aktinfasern, die physiologische Barriere wird beseitigt und AQP2 tragende Vesikel können passieren [39-41]. Nach Abklingen des AVP-Stimulus polymerisieren die Aktinfasern wieder. Während des Recyclingprozesses sind sie für den Transport von AQP2 aus EEA1-positiven frühen Endosomen zu den Rab11 positiven Recyclingendosomen essentiell [41].



**Abb. 3. AVP Signaltransduktion, AQP2 Trafficking und transzellulärer Wassertransfer**

AQP2 ist in Rab11 Vesikeln gespeichert. Die Bindung von AVP an den V2-Rezeptor aktiviert die AC und erhöhte cAMP Spiegel aktivieren die PKA. AQP2 wird im Speicherkompartiment von PKA phosphoryliert. Das führt zur Translokation von AQP2 zur apikalen Plasmamembran. Wasser fließt transzellulär, apikal durch AQP2 und basolateral durch die konstitutiv exprimierten Kanäle AQP3 und AQP4. Die Interaktion von phosphoryliertem AQP2 mit MAL erhöht dessen Aufenthaltsdauer an der Plasmamembran. Unmittelbar nach der AVP Stimulation wird AQP2 Clathrin-vermittelt endozytiert und in frühe Endosomen transportiert. Die PI3-Kinase spielt eine wichtige Rolle beim Transfer von AQP2 aus frühen Endosomen zurück zum Speicherkompartiment. Einige AQP2-Moleküle werden in multivesikuläre Körperchen transportiert. Dabei handelt es sich hauptsächlich um ubiquitiniertes AQP2, welches durch Exozytose mit dem Urin ausgeschieden wird. AC: Adenylatzyklase, AVP: L-Arginin Vasopressin, MAL: Myelin und lymphozytenassoziiertes Protein, PI3-Kinase: Phosphoinositid-3-Kinase, PKA: Proteinkinase A. Die Abbildung wurde von Takata et al. [42] übernommen.

### **1.3.3 Rolle der intrazellulären Kalziumoszillation**

Die Aktivierung des V2-Rezeptors bewirkt neben der Initiation der Signalkaskade über cAMP eine kurzfristige intrazelluläre Erhöhung des Kalziumspiegels mit anschließender Oszillation [43-46]. Der Anstieg des Kalziumspiegels wird aus intrazellulären Reserven gespeist. Die Oszillation erfolgt durch den Einstrom von extrazellulärem Kalzium. Beides ist für die apikale Translokation von AQP2 essentiell [47, 48]. Wie genau diese Kalziummobilisierung vonstattengeht, ist unklar. Chou et al. weisen jedoch darauf hin, dass der übliche Phosphatidylinositolweg und die PKC nicht involviert sind [49]. Die erhöhten Kalziumspiegel führen zur Aktivierung von Calmodulin und weiter zur Phosphorylierung und Aktivierung des Motorproteins Myosin, welches am Aktinfilament entlangwandert [48, 50-52].

Aktin und Myosin wurden als Mitglieder des Multiproteinkomplexes um AQP2 identifiziert [11]. Neben weiteren Zytoskelett-assoziierten Proteinen wurde auch ANXA2 nachgewiesen. Es besitzt Aktinbindeeeigenschaften, ist kalziumabhängig und wurde bereits in verschiedenen Endo- und Exozytoseprozessen beschrieben [5, 12, 53-56]. Aufgrund dieser Eigenschaften ist ANXA2 ein möglicher Regulator im Translokationsprozess von AQP2.

## **1.4 ANXA2 UND P11**

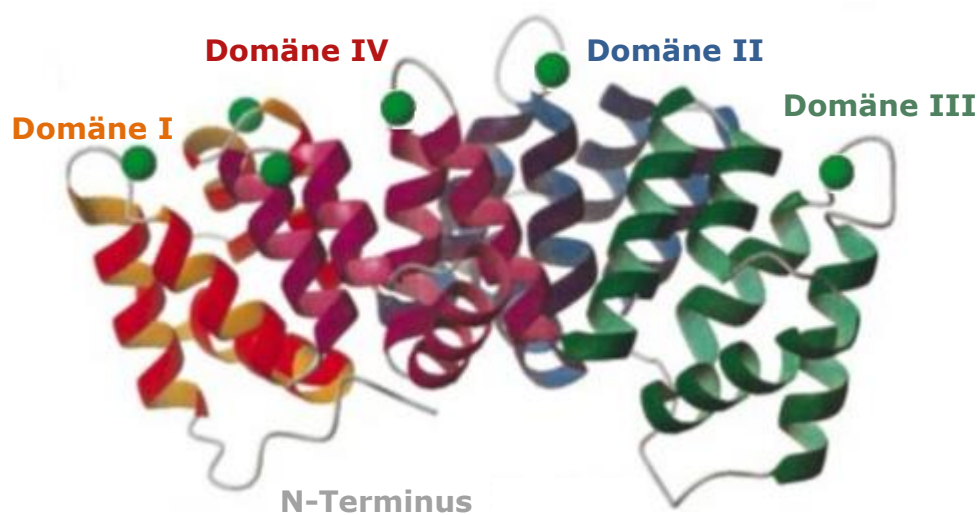
Zwei Arbeiten postulieren eine Bedeutung von ANXA2 und dem ANXA2-Bindepartner P11 im Translokationsprozess von AQP2. 2005 wurde ANXA2 im Multiproteinkomplex um AQP2 beschrieben [11]. 2008 wurde gezeigt, dass eine gestörte Interaktion von ANXA2 und P11 mit einer gestörten Fusion von AQP2-tragenden Vesikeln mit der Plasmamembran einhergeht [12]. Welche Rolle ANXA2 und P11 im Translokationsprozess von AQP2 spielen, soll in dieser Arbeit untersucht werden.

### **1.4.1 ANXA2 - ein Mitglied der Annexin Familie**

ANXA2, auch bekannt unter Lipocortin II, Calpactin I oder p36, gehört zur Familie der Annexine. Alle 12 im Menschen bekannten Familienmitglieder haben die Eigenschaft, kalziumabhängig an negativ geladene Phospholipide zu binden [57]. Diese Funktion wird von einer konservierten Kernregion, dem C-Terminus, übernommen. Der C-Terminus ist aus vier sich wiederholenden Domänen



aufgebaut (Abb. 4). Jede Domäne besteht aus fünf alpha-Helices, die durch kurze Schleifen miteinander verbunden sind. An der konvexen Molekülseite befinden sich Kalziumbindestellen, die bei ansteigendem intrazellulären Kalziumniveau besetzt werden [58-60]. Kalzium fungiert als Brücke zwischen negativ geladenen Carbonyl- und Carboxylgruppen im Proteingerüst und der negativ geladenen Phosphatgruppe von Phospholipiden [61-63]. Daher fördern erhöhte Kalziumspiegel die Bindung von Annexinen an Plasmamembranen oder Vesikel. ANXA2 bindet bevorzugt an Cholesterin [64] und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat [65, 66]. Der N-Terminus befindet sich auf der konkaven Molekülseite. Er ist variabel, für jedes Familienmitglied spezifisch und für die unterschiedlichen Eigenschaften der Annexine verantwortlich. ANXA2 bildet über seinen N-Terminus Dimere aus. Zusätzlich beinhaltet er eine Bindestelle für P11 [67]. Aktiviert durch Kalzium bindet ANXA2 also mit der konkaven Molekülseite an Membranen, sodass die konvexe Molekülseite mit dem exponierten N-Terminus von der Membran weg zeigt und für weitere Interaktionen zur Verfügung steht. Die Kalziumaffinität wird durch die Phosphorylierung der Aminosäure Y24 erheblich erhöht [58].

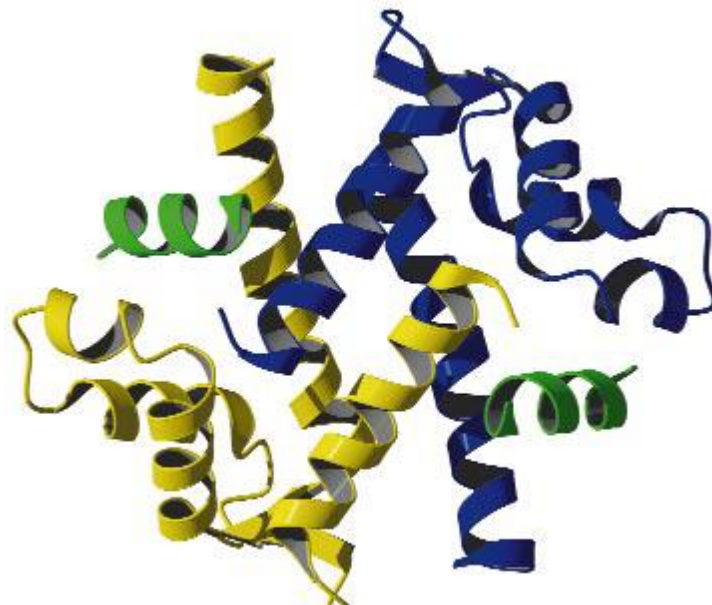


**Abb. 4. Kristallstruktur der Kernregion von Annexinen am Beispiel von Annexin I**

Die vier Domänen, die aus jeweils fünf alpha Helices bestehen sind in unterschiedlichen Farben dargestellt (1-rot, 2-blau, 3-grün, 4-violett). Gebundene Kalziummoleküle an der konvexen Molekülseite sind durch grüne Kreise gekennzeichnet. Der N-Terminus auf der konkaven Seite ist für jedes Annexin individuell. Im ANXA2 beinhaltet es die Bindestelle für P11. Die Abbildung wurde von Rosengarth et al. [68] übernommen.

### 1.4.2 P11 (S100A10) – ein Mitglied der S100 Familie

P11, auch unter den Namen S100A10 oder Annexin 2 light chain bekannt, gehört zu einer zweiten kalziumbindenden Familie, den S100 Proteinen. Im Menschen sind derzeit 19 Mitglieder bekannt [69]. S100-Proteine sind zirka 10-15 kDa kleine Moleküle, die im C- und N-Terminus eine EF-Hand ähnliche Kalziumbindestelle besitzen. Die Familienmitglieder weisen untereinander eine 50%ige Homologie auf [70, 71]. Grundsätzlich sind die S100-Proteine inaktiv. Erst die Kalziumbindung verursacht eine Konformationsänderung, die eine Interaktion mit Effektorproteinen ermöglicht. P11 ist das einzige Mitglied, welches kalziumunabhängig ist. Durch Mutationen in der Kalziumbinderegion ist es permanent in der aktiven Form arretiert und kann ohne Kalziumregulation seine Zielproteine binden [72, 73]. S100-Proteine agieren stets in dimerisierter Form. P11-Dimere besitzen zwei identische Bindestellen für ANXA2, sodass ein symmetrisch aufgebautes Heterotetramer, zusammengesetzt aus zwei P11 und zwei ANXA2 Molekülen entstehen kann (Abb. 5) [58, 73-77]. P11, welches selbst keine Membranbindeeeigenschaften besitzt wird so eine Kopplung an Membranen ermöglicht [78].



**Abb. 5. ANXA2-P11-Tetramer**

Die Abbildung zeigt ein P11 Dimer (blau und gelb) gebunden an den N-Terminus von zwei ANXA2 Molekülen (grün). Die Abbildung wurde von Rety et al. [73] übernommen.

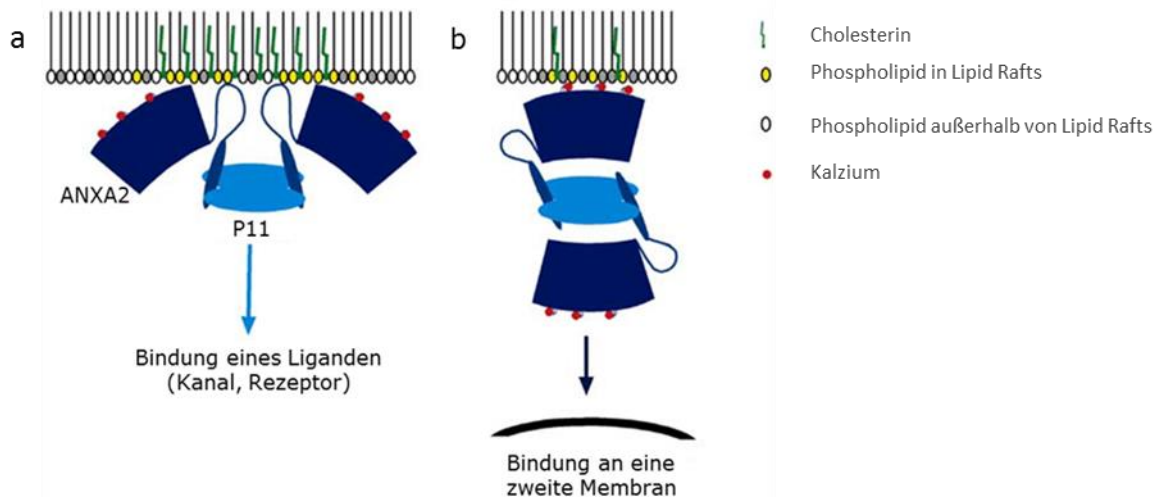
### 1.4.3 ANXA2-P11-Tetramer – Transportfunktion

Das ANXA2-P11-Tetramer bindet an das innere Blatt der Plasmamembran und an Membran-gebundene Strukturen wie Endosomen und weitere Transportkompartimente [79, 80]. Untersuchungen mit dem Rasterkraftmikroskop haben gezeigt, dass die Membranbindung des ANXA2-P11-Tetramers auf mindestens zwei Wegen stattfindet. Binden beide ANXA2-Untereinheiten an dieselbe Membran, kann das P11-Dimer einen zusätzlichen Bindepartner einbringen (Abb. 6a) [81]. Im *Yeast two-hybrid screen* wurde der Natriumkanal Nav 1.8 bereits als solch ein Bindepartner von P11 identifiziert. Diese Bindung ist notwendig für den Transport des Kanals zur Plasmamembran [6, 7]. Ähnliches wurde für die *Transient receptor potential* Kanäle (TRPV5 und TRPV6), den pH-Detektor (ASIC1a) und den Serotonin-Rezeptor (5-HT1B) beschrieben [8-10]. Entsprechend diesem Modell könnte AQP2 als direkter Bindepartner zur Plasmamembran transportiert werden.

Auch der Kaliumkanal TASK-1 wird durch die Bindung von P11 reguliert [82, 83]. Im Gegensatz zu den vorher genannten Proteinen wirken sich verringerte P11-Spiegel positiv auf die TASK-1-Expression an der Plasmamembran aus. In diesem Fall wird die Regulation sehr wahrscheinlich durch das P11-Dimer allein, ohne die Bindung an ANXA2, übernommen [83].

Binden die beiden ANXA2-Untereinheiten an verschiedene Membranen, werden diese in räumliche Nähe zueinander gebracht (Abb. 6b) [74]. Zusätzlich zu negativ geladenen Phospholipiden bindet ANXA2 auch an Cholesterol und F-Aktin und kann dadurch an dynamischen Prozessen wie Vesikelfusion und -trennung teilnehmen. Es gehört zum Aktin-reichen Komplex, der für die Formation von neuen Endosomen aus der Plasmamembran zuständig ist [4, 84] und bindet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in Bereichen wo Aktinpolymere mit der Membran verankert sind. Annexine sind aber keine Fusionsproteine, sie gewährleisten lediglich die räumliche Nähe. Für die Fusion sind wahrscheinlich SNARE-Proteine zuständig [85, 86]. Nach diesem Modell könnten AQP2-Vesikel zur Plasmamembran transportiert werden, um hier mit dieser zu fusionieren. Grundsätzlich kann ANXA2 auch als Monomer zwei Membranen aggregieren. Dabei nutzt es den N-Terminus [87]. Die Veröffentlichung von Tamma et al. [12] beschreibt aber die Interaktionsmöglichkeit von ANXA2 mit P11 als essentiell für die Fusion von AQP2-tragenden Vesikeln mit der Plasmamembran, sodass die Beteiligung von ANXA2-P11-Tetramer am wahrscheinlichsten ist.

## Einleitung



### Abb. 6. Varianten der Membranbindung von ANXA2-P11-Tetramer

Abbildung a. zeigt die Bindung von beiden ANXA2 Untereinheiten an dieselbe Membran. Der P11-Dimer ist frei und könnte einen weiteren Liganden, wie z.B. einen Kanal, binden. Abbildung b. zeigt die Bindung von beiden ANXA2-Untereinheiten an verschiedene Membranen. Grundsätzlich findet die Bindung von ANXA2 bevorzugt im Bereich von *Lipid rafts* (Cholesterin und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat angereicherte Bereiche) statt. Die Abbildung wurde übernommen aus [88].

### 1.4.4 Regulation des Transports

ANXA2 ist Bestandteil von Rab11-positiven Recyclingendosomen in Fibroblasten und in Zellen aus dem Verbindungstubulus [89, 90]. Hier wirkt ANXA2 vermutlich an Fusions- und Abschnürungsprozessen mit [91-93]. Werden ANXA2 oder P11 depletiert, verändert das die Verteilung und Morphologie von Rab11-positiven Recyclingendosomen und das Recycling des Transferrinrezeptors ist beeinträchtigt [90, 91]. Auch AQP2 ist in Rab11-positiven Recyclingendosomen lokalisiert. Da ANXA2 eine Rolle im Recyclingprozess des Transferrinrezeptors spielt, könnte AQP2 analog zu diesem Mechanismus recycled werden.

Zusätzlich ist ANXA2 auf exozytotischen Vesikeln präsent [94]. In einigen beschriebenen Fällen sind ANXA2 und F-Aktin notwendig für den Transport dieser Vesikel zu *Lipid rafts* der apikalen Plasmamembran. Das sind cholesterinreiche Mikrodomänen, die als Interaktionsplattformen der Moleküle dienen. Sie spielen eine besondere Rolle bei der Signalweitergabe. Exozytotische Vesikel die *Non-raft*-Regionen ansteuern sind F-Aktin und ANXA2 unabhängig [95].

Wie in den vorhergehenden Abschnitten beschrieben, gibt es Hinweise, die auf eine Beteiligung von ANXA2 und/oder P11 am Translokationsprozess von AQP2 hindeuten [11, 12]. Die alleinige Aktivität von P11 ist aber unwahrscheinlich. Ungebundenes P11 wird polyubiquitiniert und abgebaut [96]. Nur im Komplex mit ANXA2 wird das Polyubiquitinierungssignal maskiert und die Halbwertszeit

von P11 gesteigert. Bisherige Erkenntnisse lassen also vermuten, dass ANXA2 entweder allein, oder im Komplex mit P11 an der Translokation von AQP2 beteiligt ist.

#### **1.4.4.1 Regulation des Transports durch Kalzium**

Die Aktivierung des V2-Rezeptors durch AVP verursacht einen Anstieg von intrazellulärem Kalzium in Form von aperiodischen Spikes [97, 98]. Das ist für die apikale Translokation von AQP2 essentiell [47, 48]. ANXA2 bindet kalziumabhängig an Membranen [99, 100]. Verhält es sich ähnlich wie Annexin 1, bewirkt seine Kalziumbindung außerdem die Exposition des ansonsten im Proteinkern verborgenen N-Terminus [101]. AQP2 tragende Vesikel bzw. AQP2 direkt könnte an den exponierten N-Terminus binden und kalziumabhängig in räumliche Nähe zur Plasmamembran gebracht werden. Auch eine Bindung an das ANXA2-P11-Tetramer über P11 ist möglich. P11 ist nicht wie seine Familienmitglieder durch Kalzium regulierbar. Durch die dauerhafte Arretierung im aktivierten Zustand ist es trotzdem jederzeit in der Lage, seine Zielproteine zu binden. Da P11 zumeist gebunden an ANXA2 vorliegt, nimmt es eine Brückenfunktion ein. Wenn also AQP2 oder AQP2-tragende Vesikel an P11 binden, werden sie an ANXA2 gekoppelt. Weil ANXA2 kalziumabhängig an Membranen bindet wird auch AQP2 durch Kalziumoszillationen in räumliche Nähe zur Plasmamembran gebracht.

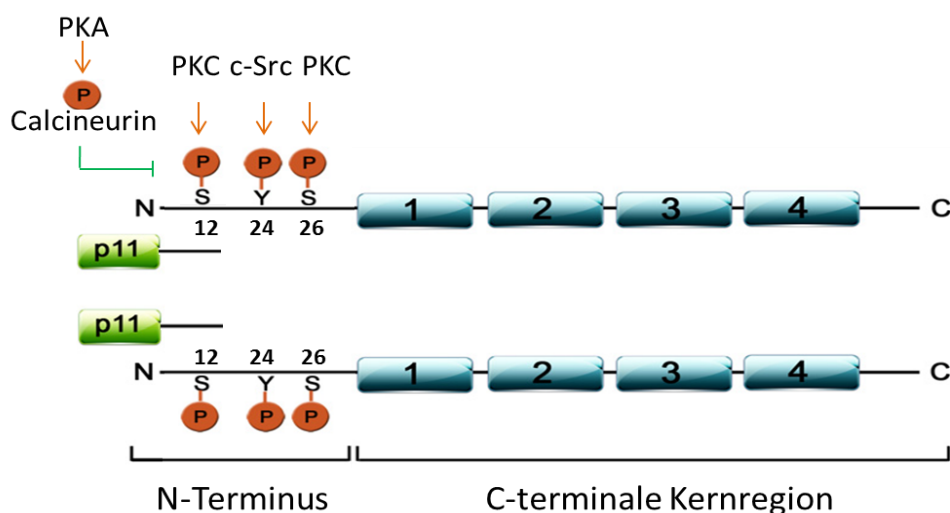
#### **1.4.4.2 Regulation des Transports durch Phosphorylierung**

Daten aus Chromaffinzellen und Endothelien zeigen, dass die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von ANXA2 durch Kalzium und cAMP-abhängige Signalwege antagonistisch reguliert wird. Der N-Terminus von ANXA2 besitzt drei Phosphorylierungsstellen und ist ein Substrat von Serin-/Threonin- und Tyrosinkinase. Unter anderem phosphoryliert die Proteinkinase C (PKC) die Serine 12 und 26 (Abb. 7) [102-104]. Die PKA phosphoryliert die Phosphatase Calcineurin, die wiederum die Aminosäure S12 von ANXA2 dephosphoryliert [105-107]. Wie S26 dephosphoryliert wird, ist unklar. Die Tyrosinkinase c-Src (cellular und sarcoma) phosphoryliert das Y24 [108-110]. ANXA2 ist also entweder an den Serinen (Kalziumsignalkaskade und PKC) oder am Tyrosin (PKA/c-Src) phosphoryliert. Da die Bindestelle von P11 an ANXA2 zwischen Aminosäure 1 und 14 liegt, sorgt phospho-S12 für eine sterische Hinderung, die

## Einleitung

eine ANXA2-P11-Tetramerbildung unmöglich macht [104]. Diese Phosphorylierung hindert ANXA2 nicht daran, an Membranen zu binden, sie stört aber seine Eigenschaft, die Membranen zu aggregieren [111]. Trotzdem postulieren diverse Studien, dass einige Exozytoseprozesse die Phosphorylierung von ANXA2 durch PKC erfordern [112-116]. Wobei eine Gefäßstudie den Transport von ANXA2-P11 Tetramer aus dem Zytosol auch der gegensätzlichen Y24 Phosphorylierung zuschreibt [117]. Dieselbe Phosphorylierung an monomerem ANXA2 ist notwendig für seine Bindung an Endosomen. Sie ist für den Transport von frühen zu späten Endosomen essentiell [56]. Die Bindung entsteht aufgrund von zwei Kopien der Aminosäuren Y, X, X und F im N-Terminus von ANXA2 [118-120]. Dieses Motiv ist essentiell für die Interaktion von ANXA2 mit den Clathrin-Adapterproteinen [121]. Phospho-Y24 verhindert die Interaktion mit dem Clathrinkomplex und damit die Clathrin-abhängige Endozytose [121]. Weiterhin führt die Phosphorylierung am Y24 des ANXA2-P11 Tetramers zum Verlust der Aktinbindefähigkeit [122].

Laut Literatur sind also ANXA2 und / oder P11 in verschiedenen Zelltypen für die Exozytose, die Endozytose und das Recycling von Bedeutung. Ein Konsens über den Phosphorylierungsgrad oder die genaue Form der beiden Proteine im jeweiligen Prozess besteht aber nicht. Zusätzlich bewirkt die V2-Rezeptoraktivierung sowohl eine Kalziumerhöhung als auch die Aktivierung des cAMP/PKA Signalweges. Beide regulieren ANXA2 in jeweils entgegengesetzte Richtungen. So ist nicht vorhersehbar wie sich ANXA2 und /oder P11 in diesem Zusammenhang verhalten.



**Abb. 7. ANXA2-P11-Heterotetramer mit Phosphorylierungsstellen**

Die vier Kernregionen von ANXA2 sind in blau, der N-Terminus als schwarze Linie und P11 in grün dargestellt. Die PKC phosphoryliert den N-Terminus am S12 und S26, c-Src am Y24. Gleichzeitig phosphoryliert die PKA Calcineurin, die S12 dephosphoryliert. Phospho-S12 verhindert aufgrund von sterischen Beeinträchtigungen die Bindung zwischen P11 und ANXA2. Die Abbildung des Tetramers wurde von Yonglitthipagon et al. übernommen [123]. Die Phosphorylierungen, Kinasen und Phosphatasen wurden hinzugefügt.

## **1.5 DIE BRATTLEBORO RATTE ALS TIERMODELL FÜR DEN ZENTRALEN DIABETES INSIPIDUS**

Die Untersuchung der V2-Signalkaskade in Ratten oder Mäusen ist mit einigen Problemen behaftet. Beide haben von Natur aus ein sehr aktives AVP-System. Sie konzentrieren ihren Urin schon im Ruhezustand vergleichsweise hoch. Daher ist der Effekt einer zusätzlichen AVP-Gabe vermutlich gering. Außerdem oszillieren die AVP-Spiegel unter physiologischen Umständen und zeigen eine zirkadiane Rhythmik [124, 125].

In der Stadt Brattleboro zeigten 1961 einige Nachkommen des Long Evans Inzuchtstammes eine Störung im Urinkonzentrierungsmechanismus. Aufgrund einer spontanen Mutation im AVP-Gen waren sie im Vergleich zu ihren Geschwistern nicht mehr in der Lage hypothalamisches AVP zu sezernieren [126]. Sie produzierten ungefähr 10-mal mehr Urin als ihre Geschwister [127]. Diese Brattleboro Ratten sind heute ein weit verbreitetes Tiermodell für Untersuchungen des zentralen Diabetes insipidus. Der periphere Signaltransduktionsapparat ist vorhanden und durch die Gabe von dDAVP (1-Desamino-8-D-Arginin-Vasopressin) stimulierbar [128, 129]. dDAVP ist ein synthetisch hergestelltes Peptid, das sturkturverwandt mit AVP ist. Im Vergleich zu AVP ist seine Affinität für V1-Rezeptoren sehr stark verringert [130-132]. Die Gabe von dDAVP hat daher hauptsächlich Auswirkungen auf die V2-Rezeptor aktivierte Signalkaskade in der Niere.

Deshalb eignen sich Brattleboro Ratten als hervorragendes Modell, um die apikale Translokation von AQP2 gezielt zu stimulieren und die an diesem Transport beteiligten Moleküle zu untersuchen.

## 1.6 ZIELE

Defekte im AVP-System können Osmolaritätsstörungen wie Hyper- und Hyponatriämie verursachen. Beim Diabetes insipidus ist der Urinkonzentrationsmechanismus aufgrund einer defekten AVP-Signaltransduktion gestört. Der Wasserkanal AQP2 ist unterexprimiert und kaum an seinem Wirkungsort, der apikalen Plasmamembran, vorhanden.

Die Translokation von AQP2 aus dem Zytosol zur Plasmamembran ist für die Konzentration des Urins essentiell. Als Transportprotein wurde ANXA2 von Noda et al. und Tamma et al. vorgeschlagen [11, 12]. Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung der Rolle von ANXA2 im Translokationsprozess von AQP2. Dazu wurden folgende Fragen untersucht:

1. Ist ANXA2 *in vivo* am Translokationsprozess von AQP2 beteiligt?
2. Bindet ANXA2 unspezifisch an AQP2-tragende Vesikel oder wird eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen ANXA2 und AQP2 ausgebildet?
3. Dient P11 als Adapterprotein zwischen ANXA2 und AQP2?
4. Spielt der Phosphostatus von ANXA2 eine Rolle bei der Interaktion mit AQP2?

Diese Arbeit soll einen weiteren Baustein zur Entschlüsselung der AVP-Signalkaskade bei der Urinkonzentrierung liefern. Die Aufklärung der grundsätzlichen Mechanismen kann helfen Osmolaritätsstörungen besser zu erkennen und zu behandeln.



## 2. MATERIALIEN

### 2.1 ANTIKÖRPER

ANXA2 Ziege	santa cruz, Heidelberg, DE
ANXA2 Kaninchen	santa cruz, Heidelberg, DE
AQP2	santa cruz, Heidelberg, DE
Caveolin	santa cruz, Heidelberg, DE
DRAQ5	ENZO LIFE SCIENCES GmbH, Lörrach, DE
NKCC2	im Labor hergestellt, Peptid gegen den N-Terminus gerichtet
P11 (S100A10)	Acris, Herford, DE

### 2.2 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN

APS	Roth, Karlsruhe, DE
10x Tangopuffer	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, DE
2-Mercaptoethanol M3148-25ml,	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, DE
5x Reaction Buffer BioScript	Bioline GmbH, Luckenwalde, DE
6x DNA loading Dye	Fermentas, St. Leon-Rot, DE
Acrylamidgel Rotiphorese® Gel 30 3023.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Bacto Agar	BD, Heidelberg, DE
Bacto Trypton	BD, Heidelberg, DE
Bacto Yeast Extract	BD, Heidelberg, DE
Benzonase	Sigma Aldrich, Hamburg, DE
BioScript	Bioline, Luckenwalde, DE
Bromphenol Blue Na-salt 15375,	SERVA GmbH, Heidelberg, DE
Calciumchlorid CaCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, DE
Calf Intestine Alkaline Phosphatase	Fermentas, St. Leon-Rot, DE
complete protease inhibitor cocktail tablets	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, DE
Difco TM Skim Milk 232100	BD, Heidelberg, DE
dNTP Mix	Quiagen, Hilden, DE
Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca & Mg	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, DE
Dynabeads antibody coupling kit	Invitrogen, Darmstadt, DE
Dynabeads® Protein G	Invitrogen, Darmstadt, DE
Ethanol absolut	Merck KGaA, Darmstadt, DE

## Materialien

Forene (Isofluran)	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, DE
Forskolin	Enzo Life Science GmbH, Lörrach, DE
GelRed™ Nucleic Acid Stain	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Rot, DE
Glycerin	Roth, Karlsruhe, DE
Glycin	Roth, Karlsruhe, DE
HCl Hydrochloric Acid 37% rauchend	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Lambda Phosphatase	Santa Cruz, Heidelberg, DE
Methanol	Merck, Darmstadt, DE
NaCl	Merck, Darmstadt, DE
Oligo(dT)18	Bioline GmbH, Luckenwalde, DE
Phusion, High-Fidelity DNA Polymerase	Biozym, Hessisch Oldendorf, DE
PMSF	Sigma Aldrich, Hamburg, DE
PreScission Protease	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, DE
Proteinmarker Dual Color	Bio-Rad, Hercules, US
RNase Inhibitor Ribolock	Fermentas, St. Leon-Rot, DE
Rotiphorese® Blau R	Roth, Karlsruhe, DE
SDS/ Natriumlaurylsulfat 4360.1	Roth, Karlsruhe, DE
SYBR® Safe DNA gel stain	Invitrogen, Darmstadt, DE
T4 DNA Ligase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, DE
TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2x)	Applied Biosystems, Carlsbad, US
Temed N'N'N'N'	Bio-Rad, Hercules, US
tetramethylethylenediamine,	
Tris-Base	Merck, Darmstadt, DE
Tris-HCL	Merck, Darmstadt, DE
Triton® X-100	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Tween® 20 rein 374470	SERVA GmbH, Heidelberg, DE
Xylol	J.T. Baker, Griesheim, DE

## 2.3 RESTRIKTIONSENZYME

Bam HI	Fermentas, St. Leon-Rot, DE
EcorRI	Fermentas, St. Leon-Rot, DE
NotI	Fermentas, St. Leon-Rot, DE

## 2.4 GERÄTE

Cryo Safe™ Cooler	Bel-Art, Wayne, US
Kryomikrotom	Leika CM 3050S, Leika, Wetzlar, DE
Elektrophoresegerät (Agarose-Gel)	Pharmacia LKB GPS 200/400, Amersham Pharmacia, Freiburg, DE
Elektrophoresegerät (SDS Gel)	Bio-Rad Power Pac 2.1, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Elektrophoresekammer	Mini Protean® Tetra Cell 30W, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Filmentwickler	Agfa Curix 60, PMA Bode, Hamburg, DE
Gefrierschrank -20°C	Philipp Kirsch GmbH, Offenburg, DE
Gefrierschrank -85°C	Nuaire, Zapf Instrument, Sarstedt, DE
Geldokumentationseinheit	AlphaImager® EC, Biozym, Hessisch Odendorf, DE
Gelkammer	Agagel™ Standard, Biometra GmbH, Göttingen, DE
Glasplatten	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Heizblock	Thermomixer comfort Eppendorf, Hamburg, DE
Kreisschüttler Certomat S	B. Braun Biotech International, Melsungen, DE
Kryostat, Leika CM 3050S	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE
Kühlschrank 4°C	Philipp Kirsch GmbH, Offenburg, DE
Lichtmikroskop	Leika DMRB, Wetzlar, DE
LSM 5 EXCITER	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, DE
Mini-PROTEAN Tetra	Bio-Rad, Hercules, US
Electrophoresis System	
NanoPhotometer	Implen GmbH, München, DE
osmotische Minipumpe	ALZET model 2001, 5ng/h
PCR Cycler	Primus 96 plus, MWG Biotech AG, Ebersberg, DE
pH-Meter	Knick 766 Calimatic, Knick, Berlin, DE
Real-time Cycler	7900 Fast, Applied Biosystems
SDS-Gelgießvorrichtung	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Semi-dry Blotter	Transblot® SD Cell 50W, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Tischzentrifuge Micro 200R 2405	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, DE
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, Hercules, US
Transmissionselektronenmikroskop (EM902)	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, DE
Waage	BP210S, Sartorius, Göttingen, DE

## Materialien

### 2.5 KITS

Plasmidpräparation -Mini	Invisorb® spin Plasmid Mini Two, STRATEC Molecular GmbH, Berlin, DE
Plasmidpräparation -Maxi	Nucleobond® AX 100, MACHEREY-NAGEL, Düren, DE
Agarosegeleextraktion	Invisorb® spin DNA Extraction Kit, STRATEC Molecular GmbH, Berlin, DE
BCA	Micro BCA™ Protein Assay Kit, Thermo scientific, Schwerte, DE

### 2.6 KOMPETENTE *E. COLI* BAKTERIEN

#### Top10

#### Genotyp

F<sup>-</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15  
ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697  
galE15 galK16 rpsL(Str<sup>R</sup>) endA1 λ<sup>-</sup>  
Invitrogen, Darmstadt, DE

#### Rosetta(DE3)pLysS

F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub>(R<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm λ(DE3 [lacI lacUV5-T7  
gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLysSRARE (Cam<sup>R</sup>)  
Merck Millipore, Schwalbach, DE

### 2.7 SOFTWARE / DATENBANKEN

7500 Fast System SDS Software 1.3.1	Applied Biosystems, Carlsbad, US
AlphaImager	Biozym
Chromas 2.01	Technelysium Pty Ltd
Excel 2010	Microsoft, Redmond, US
NCBI	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
NCBI, BLAST	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
Sequence Detection Systems SDS 2.1	Applied Biosystems, Carlsbad, US
Sequence Scanner v1.0	Applied Biosystems, Carlsbad, US
Serial Cloner 2.1	<a href="http://serialbasics.free.fr">serialbasics.free.fr</a>
UNICORN 5.2	GE Healthcare, Freiburg, DE
Word 2010	Microsoft, Redmond, US
ZEN 2008	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, DE

## 2.8 SONDEN, PRIMER, VEKTOREN

### Sonden

Spezies	Nummer	Name	Farbstoff
Ratte	Rn00571516	ANXA2	FAM/TAMRA
Ratte	4352338E	GAPDH	VIC/TAMRA
Maus	Mm01150673	ANXA2	FAM/TAMRA
Maus	4352339E	GAPDH	VIC/TAMRA

### Primer

pGEX_fwd_BamH1	5´ T TTT TTT TTC GGA TCC ATG TCT ACT GTC CAC GAA ATC C 3´
pGEX_rev_NOT1	5´ ATCCACTGTGCGGCCGCCTTCAGTCATCCCCACCACACA 3´
ANXA2_Y24D_fwd	5´ CCC CCA AGT GCC GAC GGG TCA GTC AAA CCC TAC ACC 3´
ANXA2_Y24D_rev	5´ GGT GTA GGG TTT GAC TGA CCC GTC GGC ACT TGG GGG 3´
ANXA2_Y26D_fwd	5´ CCC CCA AGT GCC TAC GGG GAC GTC AAA CCC TAC ACC 3´
ANXA2_Y26D_rev	5´ GGT GTA GGG TTT GAC GTC CCC GTA GGC ACT TGG GGG 3´
mp11_fwd_EcoRI	5´ CGACAGACTCGAATTCATGCCATCCCAAATGGAGCA 3´
mp11_rev_NotI	5´ TACCAGTGCGCGGCCGCCTACTTCTCCCTTCTGCT 3´

### Vektoren

pGEX-6P-1	GE Healthcare, Freiburg, DE
pCMV-Sport_mANXA2	ImaGenes, Berlin DE

## 2.9 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Deckgläser 24 x 60 mm	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, DE
ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, Freiburg, DE
Eppendorf Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Falcon Gefäße	Falcon Becton Dickson Labware, New Jersey, US
Glass plate, 10.1 x 7.3 cm (inner)	biostep® GmbH, Jahnsdorf, DE
Glass plate, 10.1 x 8.3 cm w. spacer 1.00 mm	biostep® GmbH, Jahnsdorf, DE
Glutathione Sepharose Beads 4FF	GE Healthcare, Freiburg, DE
Invisorb Spin DNA Extraction Kit	Stratec Molecular GmbH, Berlin, DE
Invisorb Spin Plasmid Mini Two	Stratec Molecular GmbH, Berlin, DE
Nitrozellulosemembran	MACHEREY-NAGEL, Düren, DE
NucleoBond® PC 500	MACHEREY-NAGEL, Düren, DE

## Materialien

Objektträger	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, DE
PCR Tubes	Kisker Biotech, Steinfurt, DE
Pipettenspitzen	10 µl / 200 µl / 100 µl, Sarstedt , Nümbrecht, DE
qPCR 96Well Platten	MicroAmp® Fast optical 96Well Plate, Applied Biosystems, Darmstadt, DE
radiographischer Film	Fujifilm Medical X-Ray Film 100NIF 4.7410 19236 FUJIFILM Europe GmbH, Düsseldorf, DE
RNeasy Micro Kit	Quiagen, Hilden, DE
Semi-Micro Küvetten	Bio-Rad, Hercules, US
Sterican Kanülen 18 Ø 0,45 x 25mm 26G x 1	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Sterilfilter 0,45 µm	Merck Millipore, Schwalbach, DE
Superdex high load 75 16/60	GE Healthcare, Freiburg, DE R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, DE
SuperFrost® plus-Objektträger	Clonetechnologies Inc, Mountain View, US
TALON® His-Tag Resin Beads	Clonetechnologies Inc, Mountain View, US
Whatmanpaper	Camlab limited, Cambridge, UK

## **3. METHODEN**

### **3.1 TIEREXPERIMENTE**

#### **3.1.1 Versuchstiere und Behandlung**

Alle Tierexperimente erfolgten nach den Vorschriften des National Institute of Health und wurden von dem LAGESO Berlin genehmigt (G006-02/05 und G0285/10). Die Tiere wurden unter kontrollierten Umweltbedingungen bei 22 bis 24°C, einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus sowie einer relativen Luftfeuchtigkeit von 40 bis 60% gehalten. In dieser Arbeit wurden ausschließlich männliche Tiere im Alter von 12 Wochen und einem Gewicht von 250 g bis 300 g untersucht. Zu Fragen des Urinkonzentrierungsmechanismus wurden Brattleboro und Long-Evans Ratten analysiert. Sprague-Dawley Ratten wurden für Immunpräzipitations-Experimente verwendet.

##### **3.1.1.1 Brattleboro Ratten**

Die Brattleboro Ratten wurden aus der lokalen Zucht genommen und in der Tiereinrichtung der Charité (FEM-Berlin) mit freiem Zugang zu Wasser und der Standarddiät gehalten. Die Tiere wurden in zwei Gruppen mit jeweils fünf Männchen aufgeteilt. Gruppe 1 wurde drei Tage lang mit dDAVP über eine osmotische Minipumpe (5ng/h) behandelt. Die Kontrollgruppe erhielt nur die 0,9-prozentige Kochsalzlösung in der das dDAVP gelöst war. Nach drei Tagen wurden die Nieren für biochemische Analysen entnommen oder für die immunhistologische Untersuchung perfusionsfixiert. Die Tierexperimente wurden, wie bereits beschrieben, von Dr. med. Alexander Paliege durchgeführt [133]. Insgesamt wurden 30 Tiere untersucht.

### **3.2 PROTEINANALYTISCHE METHODEN**

#### **3.2.1 Immunhistologie und Immunzytologie**

##### **3.2.1.1 Herstellung von Kryostatschnitten**

Als Gefrierschutz wurden halbierte perfundierte Nieren ü.N. bei 4°C in PBS / 800mOsm Sukrose eingelegt und in Stickstoff gekühltem Isopentan eingefroren.

## Methoden

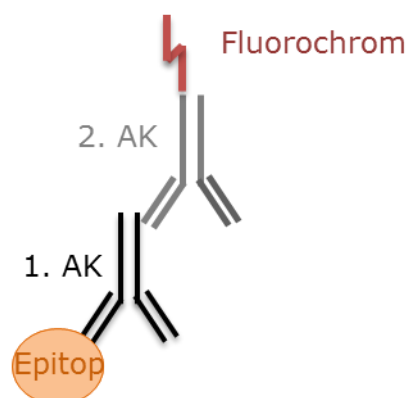
Die weitere Lagerung erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Für eine immunhistologische Analyse wurden  $5\ \mu\text{m}$ -dünne Schnitte im Kryostaten hergestellt und auf adhäsiv beschichtete Objektträger fixiert.

### 3.2.1.2 Herstellung von Paraffinschnitten

Teile der perfusionsfixierten Nieren wurden ü.N. in der Perfusionslösung bei  $4^{\circ}\text{C}$  nachfixiert und danach in 300mOsm Sukrose / PBS / 0,02%Natriumacid (v/v) gelagert. Die Paraffineinbettung erfolgte automatisiert in der Kinderpathologie des CCM.

### 3.2.1.3 Färbung von immunhistologischen Präparaten

Die Lokalisation von Proteinen in einem Gewebe oder in einzelnen Zellen erfolgt in der Immunhistologie bzw. Immunzytologie durch die Antigen-Antikörper Reaktion. Wie in Abb. 8 dargestellt bindet ein Antikörper ein für ihn spezifisches Epitop. Zum optischen Nachweis dieser Interaktion wird ein zweiter Antikörper mit gekoppeltem Fluorochrom, welcher gegen die Spezies des ersten Antikörpers gerichtet ist, eingesetzt. Die Anregung des Fluorochroms mit monochromatischem Licht bestimmter Wellenlängen führt zur Emission spezifischer Wellenlängen. Dieses Signal wurde mithilfe eines konfokalen Laserscanningmikroskops aufgenommen. Um die Bindung der Antikörper an unspezifische Epitope zu vermeiden, wurde diese durch 5%-ige Magermilch blockiert. Die Permeabilisierung der Plasmamembran, welche für die Zugänglichkeit der Antikörper unumgänglich ist erfolgte je nach Präparattyp durch Kochen in Zitratpuffer oder durch TritonX Behandlung (Tab. 1).



**Abb. 8. Schematische Darstellung der indirekten Methode der Proteinlokalisierung mittels Immunfluoreszenz**



**Tab. 1. Schrittfolge zur Proteinlokalisierung in Geweben und Zellen mittels Immunfluoreszenz**

Paraffinschnitte		Kryostatschnitte	
Entparafinieren		Auftauen	
Xylol	3x10 Min	Auftauen	
Alkoholreihe	6x5 Min	mit PapPen umranden	
Absteigend			
in PBS abspülen	1 Min	in PBS abspülen	1 Min
Membranpermeabilisierung		Membranpermeabilisierung	
Kochen in	6 Min	0,5% TritonX	30 Min
Zitratpuffer pH 6			
in PBS abspülen	1 Min	in PBS waschen	3x5 Min
mit PapPen umranden			
5% Magermilch in PBS	30 Min		
1. Antikörper in 5% Magermilch/PBS	30 Min RT, 4°C ü.N		
in PBS waschen	3x5 Min		
2. Antikörper in 5% Magermilch/PBS	1h RT		
in PBS waschen	3x5 Min		
Kernfärbung mit DRAQ5	5 Min		
eindecken in PBS/Glycerin (1:3)			

### 3.2.2 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Zur Darstellung der Plasmamembran wurde die Transmissionselektronenmikroskopie eingesetzt. Während die Auflösung im Lichtmikroskop bei maximal 200nm, bedingt durch die eingesetzte Wellenlänge begrenzt ist, kann im Elektronenmikroskop eine Auflösung von 0,1 nm erreicht werden.

#### 3.2.2.1 Herstellung von Ultra-Kryo Schnitten

Als Gefrierschutz wurden perfusionsfixierte Nierenteile ü.N. bei 4°C in PBS / 2,3M Saccharose eingelegt. Die weitere Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff. Mit einem frisch gebrochenen Glasmesser wurden im Ultra-Kryomikrotom bei -80°C quadratische Blöckchen mit einer maximalen Kantenlänge von 1mm zurechtgetrimmt. Aus diesen Blöckchen wurden 70 nm dünne Schnitte hergestellt. Die Schnitte wurden auf Formvarbefilmte Dünnstegnetzchen überführt und bei 4°C gelagert. Zum Schutz vor Austrocknung wurden sie vorher mit 2% Methylzellulose und 2,3M Saccharose im Verhältnis von 1:1 überschichtet.

### 3.2.2.2 Immungoldmarkierung von Ultra-Kryo Schnitten

Die Lokalisation von Proteinen in einem Gewebe erfolgt in der Elektronenmikroskopie durch die Antigen-Antikörper Reaktion. Zum optischen Nachweis ist der zweite Antikörper an kolloidales ein Gold gekoppelt. Die Lokalisation der Goldgrana und damit der untersuchten Proteine wurde im Transmissionselektronenmikroskop ermittelt. Um eine Bindung der Antikörper an unspezifische Epitope zu vermeiden, wurden diese durch BSA blockiert. Die Kontrastierung des Gewebes erfolgte mittels Uranylacetat (Tab. 2).

**Tab. 2. Schrittfolge zur Proteinlokalisierung in Geweben mittels Immungoldfärbung**

Vorgang	Substanz	Dauer
Entfernen von Methylzellulose/Saccharose	0,1 M PBS	3x5 Min
Blocken unspezifischer Epitope	0,1M PBS / 0,1% Glycin / 1%BSA	30 Min
Inkubation mit Primärantikörper	Anti-ANXA2 aus Kaninchen	1 h RT, 4°C ü.N.
Entfernung ungebundener Antikörper	0,1M PBS / 0,1% Glycin / 1%BSA	3x5 Min
Inkubation mit Sekundärantikörper	10nm Gold aus der Ziege gegen Kaninchen	1 h
Entfernung ungebundener Antikörper	0,1M PBS / 0,1% Glycin / 1%BSA	3x5 Min
Nachfixierung der Schnitte	2,5% Glutaraldehyd in 0,1M PBS	5 Min
Entfernung restlichen Glutaraldehyds	aqua dest	2x10 Min
Kontrastierung des Gewebes	4% Uranylacetat	4 Min, 4°C
Austrocknungsschutz	Methylzellulose / Saccharose / Uranylacetat 2% / 2,3M / 0,4%	4 Min, 4°C
Trocknen		Ü.N. RT

### 3.2.3 Herstellung von Nierenlysaten aus Ratten für Ko-Immunpräzipitationen

Sprague-Dawley Ratten wurden mit Isofluran narkotisiert und durch Genickbruch getötet. Anschließend wurden beide Nieren entfernt, entkapselt und der Bereich der inneren Medulla abgetrennt. Dieser Teil wurde in 2ml IP-Puffer aufgenommen, mittels Ultra-Turrax und Ultraschall (5 Impulse, Stärke 70) homogenisiert und anschließend bei 4°C und 800xg für 10min zentrifugiert. Das im Überstand befindliche Proteinlysate für die Ko-Immunpräzipitationen wurde so von Zellkernen und nicht aufgeschlossenen Zellen getrennt.

#### **IP Puffer 50ml**

TBS

0,5% Tween

1x Complete Protease inhibitor cocktail tablets

### 3.2.4 Ko-Immünpräzipitation

Mithilfe von Ko-Immünpräzipitationen können Wechselbeziehungen von Proteinen aufgedeckt werden. Dabei kommen Antikörper zum Einsatz, die in einer Lösung ihr spezifisches Antigen binden und mitsamt seiner Interaktionspartner präzipitieren. Um herauszufinden ob ANXA2 oder P11 mit AQP2 interagieren wurden zuvor nach Anleitung des Dynabeads<sup>®</sup> antibody coupling kit (Invitrogen Dynal AS; Oslo, Norwegen) 5 µl ANXA2-Ziege-Antikörper bzw. zur Kontrolle 5 µl gt-IgG an 5 mg Dynabeads<sup>®</sup> M-270 Epoxy, gekoppelt. Jeweils 500 µl des Proteinlysates der inneren Medulla von Rattennieren (siehe 3.2.3) wurde auf Kontroll- und ANXA2-Antikörper gekoppelte Beads gegeben. Die Inkubation erfolgte im Überkopfschüttler bei 4°C über Nacht. Nach zweimaligem Waschen der Beads mit IP Puffer (doppelte Salzkonzentration), wurden die gebundenen ANXA2 Proteinkomplexe in je 30 µl 4x Laemmli Puffer eluiert.

Für Inhibitionsstudien wurden synthetische Peptide aus dem Intrazellulärbereich von AQP2 eingesetzt (Tab. 3). Vor dem Vereinen des Proteinlysates mit den gekoppelten Antikörpern wurde es mit 300 nmol der AQP2-Peptide 1, 6 und 9 einzeln oder gemeinsam, für eine Stunde bei 4°C im Überkopfschüttler, inkubiert.

Der Nachweis einer Immünpräzipitation oder Ko-Immünpräzipitation von ANXA2, P11 und AQP2 erfolgte mit den spezifischen Antikörpern durch SDS-PAGE und *Westernblot* (siehe 3.2.8, 3.2.9). Vom Eluat wurden jeweils 20 µl, zum Vergleich jeweils 5 µl Input und 5 µl Nierenlysat aus der Rattenniere aufgetragen.

#### Tab. 3. AQP2-Peptide 1, 6 und 9

Die drei Peptide aus dem Intrazellulärbereich von AQP2 wurden von Dr. M. Meyerman aus der Arbeitsgemeinschaft Peptidsynthese vom FMP-Berlin, wie bereits beschrieben [134], hergestellt.

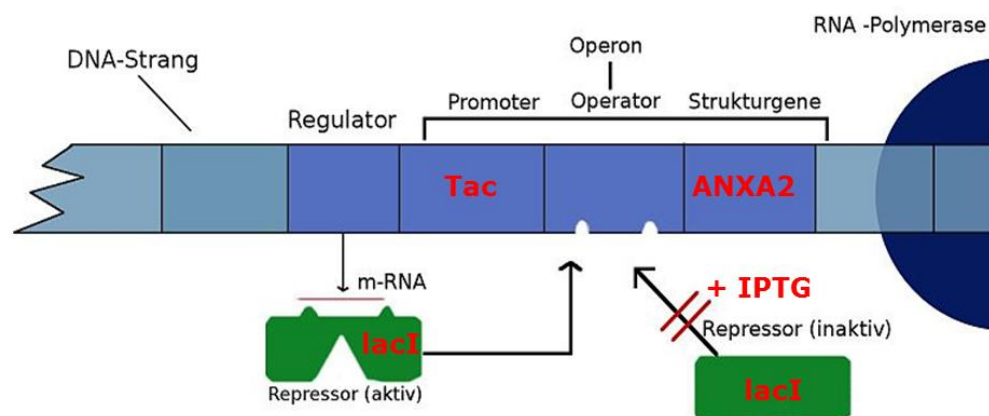
Peptid	Sequenz	m/z	HPLC-Reinheit
1	M-W-E-L-R-S-I-A-F-S-R-A-V-L-A-E	1877.0	75.5%
6	L-Q-E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R	3091.7	70.0%
9	D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-S-V-E-L-H-S-P-Q-S-L-P-R-G-S	3031.5	88.5%

### 3.2.5 Expression von rekombinanten Proteinen

Für die Expression von P11, ANXA2 und dessen Mutanten ANXA2\_Y24D und ANXA2\_S26D, wurden verschiedene E.coli Stämme mit den unter 3.3.2

## Methoden

hergestellten Plasmiden transformiert. Dabei zeigten Rosetta Zellen bei 30°C die stärkste Expression und wurden für die folgenden Experimente eingesetzt. Der verwendete pGEX-6P-1 Vektor ist für die Proteinproduktion optimiert (Abb. 9). Er kodiert für das lacI Gen, welches den eigenen vor den Strukturgenen P11, ANXA2, ANXA2\_Y24D oder ANXA2\_S26D liegenden tac Promotor supprimiert. Eine Induktion mit IPTG hemmt lacI in seiner Funktion als Repressor. So kann zunächst für eine optimale Zelldichte gesorgt werden um daraufhin alle Zellen gleichzeitig auf die Transkription der Strukturgene umzustellen. Bei einer optischen Dichte von 0,5 bei 600 nm wurden zwei Liter einer Flüssigkultur mit transformierten Zellen mit 0,1mM IPTG behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 5h bei 30°C wurden sie bei 4000g für 10min pelletiert und schockgefroren.



### **Abb. 9. IPTG abhängige Induktion von Strukturproteinen unter dem tac Operon auf dem pGEX-6.1 Vektor**

Der Tac Promotor auf dem pGEX-6P-1 Vektor wird durch den Repressor lacI unterdrückt. IPTG Stimulation inhibiert die Bindung vom Repressor an das Operon. Die RNA Polymerase bindet an den Promotor und liest das Strukturgen, hier am Beispiel von ANXA2 gezeigt, ab. Die Abbildung wurde von <http://bio-abi.de> übernommen. Rot beschriftete Bestandteile wurden ergänzt.

### 3.2.6 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Die unter 3.2.5 hergestellten Fusionsproteine sind durch die Fusion mit Glutathion-S-Transferase (GST) von den restlichen bakteriellen Proteinen einheitlich abgrenzbar. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für ihre affinitätschromatische Aufreinigung. Um später jedoch Effekte durch GST zu vermeiden, wurde es im Laufe der Aufreinigung entfernt.

Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt, um einen Verdau der Proteine zu vermeiden. Zusätzlich enthielt der Resuspensionspuffer verschiedene Proteaseinhibitoren, DTT als Oxidationsschutz und Benzonase für den Verdau von Chromatin. Die in Suspension gebrachten Zellen wurden in einer *French Press* aufgeschlossen, die Löslichkeit der Proteine durch Zugabe von 0,1% Tween erhöht und unlösliche Bestandteile bei 17000xg abzentrifugiert. Um eine bakterielle Kontamination zu vermeiden wurde der Überstand mit den löslichen Proteinen durch einen 0,45 µm Filter sterilfiltriert.

#### **Resuspensionspuffer 100ml**

1x PBS pH 7.5

0.5mM PMSF

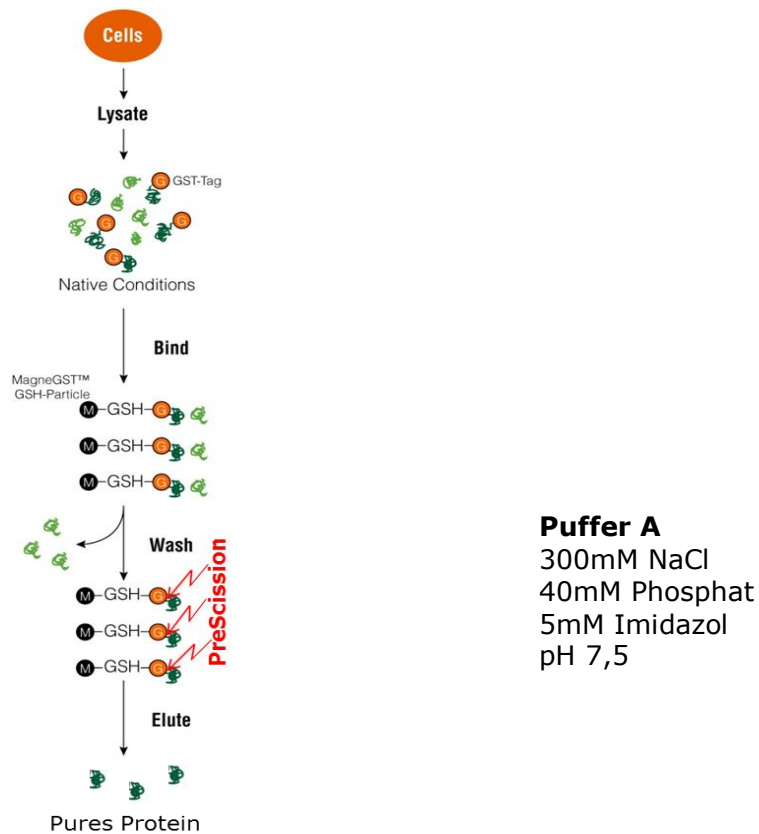
2 Tabletten complete protease inhibitor

1mM DTT

1000 Units Benzonase

#### **3.2.6.1 Affinitätschromatographie im Batch-Verfahren**

Für den ersten Aufreinigungsschritt wurde die unter 3.2.5 hergestellte Lösung für eine Stunde mit 1,5ml Glutathion-Sepharose Beads bei 4°C inkubiert (Abb. 10). In dieser Zeit bindet die Glutathion-S-Transferase (GST) der Fusionsproteine an ihr Substrat, Glutathion, auf den Beads. Die Elution der rekombinanten Proteine erfolgte ü.N. für 16 Stunden mit der PreScission Protease, die genau zwischen GST und dem anschließenden Strukturprotein schneidet. Vorher wurde der Resuspensionspuffer einschließlich der Proteaseinhibitoren durch viermaliges Waschen mit PreScissionpuffer entfernt. Durch Abnahme des Überstandes und weiteres sechsmaliges Waschen der Beads mit 750 µl Puffer A wurde das geschnittene Protein geerntet. Die noch in der Lösung befindliche His-getagte PreScission wurde durch Inkubation mit 70 µl Talon Beads für 15 Min bei 4°C entfernt.



**Abb. 10. affinitätschromatische Auftrennung von GST-Fusionsproteinen**

Die Abbildung wurde von Promegas „Protocols & Application Guide“ aus dem Abschnitt „Protein purification Analysis“ übernommen. Die rot markierte PreScission wurde ergänzt.

**3.2.6.2 High pressure liquid chromatographie (HPLC)**

Die Gelchromatographie dient der Auftrennung von Proteinen und anderen Molekülen aufgrund von Größenunterschieden. Dazu durchläuft ein Proteingemisch in einem Laufpuffer, angetrieben durch Druck, eine Säule mit einer Matrix aus unterschiedlich großen Poren. Kleine Proteine können besser in die Poren eindringen, sodass große Proteine die Säule schneller durchlaufen. Die Porengröße der hier verwendeten Superdex 75 highload 16/60 Säule ist ideal um Moleküle zwischen 3 kDa und 70 kDa voneinander zu trennen.

Die in der Affinitätschromatographie gewonnenen Proben wurden mithilfe von Amicon Ultra Zentrifugenfiltern auf unter 2ml Volumen konzentriert und dann auf die Säule aufgetragen. Mittels der programmierten Software UNICORN 5.2 (Tab. 4), konnte die an das Chromatographiesystem angeschlossene Säule gesteuert werden. Der Laufpuffer wurde kontinuierlich beim Verlassen der Säule mit UV Detektoren analysiert. Anhand des so aufgezeichneten Chromatogramms war abzulesen welche Fraktionen des aufgefangenen Laufpuffers das gewünschte Protein enthielten. Diese Fraktionen wurden in der Comassie-Blau-Färbung (siehe 30

3.2.10) auf ihre Reinheit überprüft und mit 20% Glycerin bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über das Molekulargewicht und den Extinktionskoeffizienten im Nanodrop-Spektralphotometer.

**Tab. 4. UNICORN Programm der HPLC**

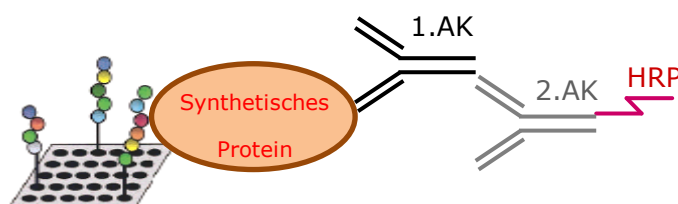
Equilibrierung:	Laufpuffer	156ml	2ml/min
Probenauftrag:		< 2ml	1ml/min
Probenauftrennung:	Laufpuffer	150ml	1ml/min
Fraktionierung		1ml	

**Laufpuffer**

20 mM HEPES pH 7.0  
300 mM NaCl

### 3.2.7 Peptid SPOT Array

*Peptid SPOT Arrays* dienen zur Identifikation von linearen Peptidomänen-Bindemotiven [135]. Um herauszufinden ob solche Motive zwischen AQP2 und ANXA2 bzw. P11 zu einer Bindung führen, wurden Peptide, die den gesamten zytosolischen Bereich von AQP2 darstellen, auf eine Zellulosemembran synthetisiert. Diese Membranen wurden mit den synthetisch hergestellten Proteinen ANXA2, ANXA2\_Y24D, ANXA2\_S26D und P11 einzeln bzw. als Tetramer in Kombination mit P11 inkubiert. Der Nachweis der Interaktion erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen P11 oder ANXA2 (Abb. 11).



**Abb. 11. Interaktion von Peptidomänen mit Protein und immunchemischer Nachweis.**

Ein Peptid aus dem Bereich der Intrazellulärdomänen von AQP2, gekoppelt an eine Zellulosemembran, interagiert mit einem synthetisch hergestellten Protein. Der Nachweis dieser Interaktion erfolgt mit spezifischem Primer- und Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppeltem Sekundärantikörper. Die Darstellung der Peptid-SPOTs wurde von Weschuh et al. [136] übernommen. Die Nachweiskaskade (synthetisches Protein bis HRP) wurde ergänzt.

#### 3.2.7.1 Herstellung von Peptid SPOTs

Die AQP2 *Peptid SPOTs* mit folgenden Sequenzen (Tab. 5) wurden von Angelika Ehrlich (FMP Berlin) synthetisiert. Die Herstellung erfolgte, wie vorher beschrieben durch Auto-SPOT-Synthese auf Whatman 50 Zellulosemembranen mithilfe eines AutoSpot-Roboters [137-139].

**Tab. 5.**

AQP2 Ratte

B 1 M-W-E-L-R-S-I-A-F-S-R-A-V-L-A-E  
B 2 G-H-V-S-G-A-H-I-N-P-A-V-T-V-A-S-L-V-G-S-H-V-S-F-L  
B 3 H-V-S-G-A-H-I-N-P-A-V-T-V-A-S-L-V-G-S-H-V-S-F-L-R  
B 4 T-D-E-R-R-G-D-N  
B 5 P-S-A-K-S-L-Q-E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R  
B 6 L-Q-E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R  
B 7 A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-S-V-E-L  
B 8 L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-S-V-E-L-H-S-P-Q-S  
B 9 D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-S-V-E-L-H-S-P-Q-S-L-P-R-G-S  
B10 E-E-R-E-V-R-R-R-Q-S-V-E-L-H-S-P-Q-S-L-P-R-G-S-K-A

AQP2 Maus

C 1 M-W-E-L-R-S-I-A-F-S-R-A-V-L-A-E  
C 2 G-H-V-S-G-A-H-I-N-P-A-V-T-V-A-S-L-V-G-S-H-V-S-F-L  
C 3 H-V-S-G-A-H-I-N-P-A-V-T-V-A-S-L-V-G-S-H-V-S-F-L-R  
C 4 T-D-E-R-R-S-D-N  
C 5 P-S-T-K-S-L-Q-E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R  
C 6 L-Q-E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R  
C 7 A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-S-V-E-L  
C 8 L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-S-V-E-L-H-S-P-Q-S  
C 9 D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-S-V-E-L-H-S-P-Q-S-L-P-R-G-S  
C10 E-E-R-E-V-R-R-R-Q-S-V-E-L-H-S-P-Q-S-L-P-R-G-S-K-A

### 3.2.7.2 Bindungsstudien: rekombinante Proteine und *Peptid SPOT Array*

Die unter 3.2.7.1 generierten Membranen wurden kurz mit Ethanol aktiviert, anschließend mit MilliQ und TBST gewaschen. Die unspezifischen Bindestellen wurden für eine Stunde in 5% Magermilch / PBS geblockt. Die Inkubation mit einer 0,2 µM Lösung der synthetisch hergestellten Proteine ANXA2, ANXA2\_Y24D, ANXA2\_S26D und P11 erfolgte ü.N. bei 4°C. Die Inkubation der Membranen mit einer Kombination aus P11 und den einzelnen ANXA2-Varianten wurde erst nach einer einstündigen Bindezeit zur Tetramerbildung bei 4°C vorgenommen. Nach Entfernung der ungebundenen Proteine durch dreimaliges Waschen mit TBST erfolgte eine einstündige Inkubation der Membran entweder mit ANXA2- oder P11-Antikörper in Blockpuffer. Der Nachweis einer Bindung erfolgte durch Meerrettichperoxidase-gekoppelte Sekundärantikörper wie unter 3.2.9 beschrieben.

**TBST: Tris buffered saline**

50 M Tris  
150 mM NaCl  
0.05% Tween 20  
pH 7.6



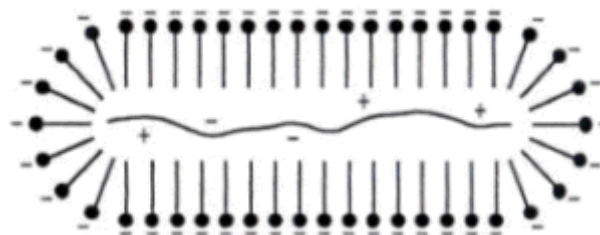
### 3.2.8 Natrium-Dodecyl-Sulfat-Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Mit der SDS-PAGE Methode nach Laemmli *et al.* [140] können Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Dazu wurden standardmäßig 30 µg Proteinlysate mit einem 4x Laemmli Puffer versetzt und für 5 Min auf 95°C erhitzt.

#### 4x Laemmli Puffer

Tris/HCL	252mM
Glycerin	40%
SDS	8%
Bromphenolblau	0,04%
DTT	40mM
pH	6,8

Die Sulfatgruppen des anionischen Detergens, SDS, lagern sich an Proteine an und überdecken somit deren natürliche Ladung. Zusätzlich werden Disulfidbrücken durch DTT reduziert. So entstehen aus kompakten Tertiär- und Quartär-Strukturen langgestreckte Proteine, die negativ geladen sind und deren Länge proportional zu ihrer Größe ist (Abb. 12). Zur Auftrennung dieser Proteine wird eine Gelmatrix auf Polyakrylamidbasis verwendet. Dazu wurde zuerst das Trenngel, welches je nach Größe der aufzutrennenden Proteine 10% bis 12% Akrylamid/Bisakrylamid enthielt, zwischen zwei Glasplatten gegossen und anschließend mit einem 3,7%igem Sammelgel, in welchem Taschen für die Auftragung der Proteine frei gehalten wurden, überschichtet (Tab. 6). Akrylamid/Bisacrylamid polymerisiert in Gegenwart des Radikaldonors Ammoniumpersulfat (APS). TEMED katalysiert diese Reaktion. Nach Bettung des fertigen Gels in Elektrophoresepuffer und Ladung der Proteinproben wurden diese im elektrischen Feld erst im Sammelgel zu einer scharfen Bande aufkonzentriert (ca. 120V) und im anschließenden Trenngel nach ihrer Größe aufgetrennt (ca. 160V).



**Abb. 12. Schematische Darstellung eines denaturierten Proteins, umlagert von SDS Molekülen.**

Die Abbildung stammt aus [141].

Gelpuffer	Elektrophoresepuffer
3M Tris-Base	25mM Tris-Base
0,3 % SDS	0,1%SDS
pH 8,45	192mM Glycin

**Tab. 6 Zusammensetzung der SDS-Gele**

	Sammelgel (3,7%)	Trenngel (10%)
Akrylamid/ Bisacrylamid 37,5 / 1	0,5 ml	3,5 ml
Gelpuffer	1 ml	3,5 ml
Glycerin	-	1,25 ml
Milli Q	2,5 ml	2 ml
APS	50 µl	100 µl
TEMED	5 µl	5 µl

### 3.2.9 Westernblot (Immunblot)

Mithilfe der Methode des *Westernblots* werden im Gel aufgetrennte Proteine auf eine Membran übertragen, immobilisiert und durch spezifische Antikörper nachweisbar. In einem Bad aus Blotpuffer wurde hierzu ein Sandwich aus Whatmanpapier, einer Nitrozellulosemembran, dem Gel aus der Gelelektrophorese und einem weiteren Whatmanpapier zusammengestellt. Durch Anlegen einer Spannung von 80mV im Semidry-Blot-System wurden die Proteine vom Gel auf die Nitrozellulosemembran übertragen.

#### **Blotpuffer**

3g Tris  
14,4g Glycin  
10% Methanol

Die unspezifischen Bindungsstellen wurden durch 30-minütige Behandlung der Membran mit 5% Magermilch in PBS abgeblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Primärantikörpern und Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörpern. Die ungebundenen Antikörper wurden jeweils durch dreimaliges Waschen mit PBS/5%Tween entfernt, sodass die Zugabe von *ECL Western Blotting Detection Reagents* nur in Bereichen mit gebundenen Sekundärantikörpern zur Wasserstoffperoxid-abhängigen Oxidation von Luminol führte (Abb. 13).



### **3.3 MOLEKULARGENETISCHE METHODEN**

#### **3.3.1 Genexpressionsanalyse**

Der Nachweis eines bestimmten Proteins in einem Zelltyp über *Westernblot* oder Immunhistochemie sagt nicht aus ob dieser Zelltyp das nachgewiesene Protein auch selbst exprimiert. Um das herauszufinden kann die mRNA analysiert werden, welche nicht nur Aufschluss über eine Expression im allgemeinen, sondern auch Rückschlüsse auf Expressionsspiegel im Vergleich zu evtl. unterschiedlich behandelten Zellen oder Tieren liefert. Für diese Analyse wurde die instabile RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben mittels *Realtime-PCR* (*Polymerase-Chain-Reaction*) und *TaqMan*-Sonden untersucht.

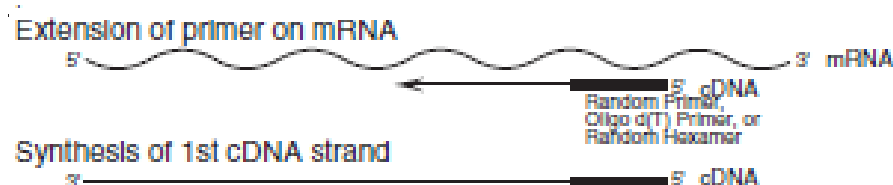
##### **3.3.1.1 RNA Extraktion mittels Säulenaufreinigung**

Die Extraktion von RNA aus Gewebe oder Zellen ist aufgrund der ubiquitär vorkommenden RNasen anspruchsvoll. Um einen Verdau der RNA während der Präparation zu vermeiden muss mit RNase freien Materialien gearbeitet werden. Hierzu wurden Nieren aus dDAVP-behandelten und -unbehandelten Brattleboro Ratten direkt nach ihrer Entnahme schockgefroren und in flüssigem Stickstoff zu Pulver zermörsert, bzw. mikrodissiziierte Tubuli, bereitgestellt von Markus Bleich, pelettiert. Die RNA wurde mithilfe des RNA-Extraktionskits von Quiagen nach Herstellerangaben gewonnen. Das Aufreinigungsverfahren beruht auf einer Säulenmatrix aus Silizium, die negativ geladene RNA-Moleküle bindet. Die Zellen bzw. das Gewebe wurde im Lysispuffer mittels Ultraschall aufgeschlossen. Das Guanidinthiocyanat und beta-Mercaptoethanol im Lysispuffer führt zur Denaturierung der sich im Lysat befindenden Proteine. Etwaige DNA-Fragmente, welche an die Säule gebunden hatten, wurden durch einen DNase Verdau-Schritt zerstört und herausgewaschen, sodass die Elution mit 50 µl MilliQ zu einer reinen RNA Probe führte. Um eine Degeneration auszuschließen wurde die extrahierte RNA im Agarosegel auf das Vorhandensein der 18S und 28S rRNA untersucht.

##### **3.3.1.2 cDNA Synthese**

Bei der *Reversen-Transkriptase-PCR* wird RNA in stabilere und amplifizierbare cDNA umgeschrieben. Die hier verwendete reverse Transkriptase, BioScript, aus dem Murinen Moloney Leukämie Virus ist RNA-abhängig und benötigt für die

Initiation der Elongation einen DNA *Primer*. Der Oligo(dT)<sub>18</sub> *Primer* hybridisiert mit dem poly-A-Schwanz am 3' Ende der extrahierten mRNA. Die BioScript erkennt die RNA/DNA Hybride und schreibt den gesamten Pool an extrahierter mRNA in einzelstängige cDNA um (Abb. 14). Die exakten Konzentrationen der einzelnen Reagenzien, sowie Inkubationszeiten und Temperaturen sind in Tab. 7. dargestellt. Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C gelagert.



**Abb. 14. Schematische Darstellung der Reversen-Transkriptase-PCR**  
aus dem User Guide des *TaqMan Fast Universal PCR Master Mix* von Applied Biosystems

**Tab. 7. Pipettierschema zur cDNA Synthese**

1-5 µg	total RNA
0,5 µg	Oligo(dT) 18
auf 12µl auffüllen	nukleasefreies Wasser
5min auf 70°C, Kälteschock auf Eis	
10 Units	RNase Inhibitor
1 µl	DTT
1 µl	40mM dNTP mix (10mM each)
4 µl	5x Reaktionspuffer
auf 19,5 µl auffüllen	Nukleasefreies Wasser
0,5 µl	BioScript

1h bei 37°C

Inaktivierung der Transkriptase bei 70°C für 10 Min.

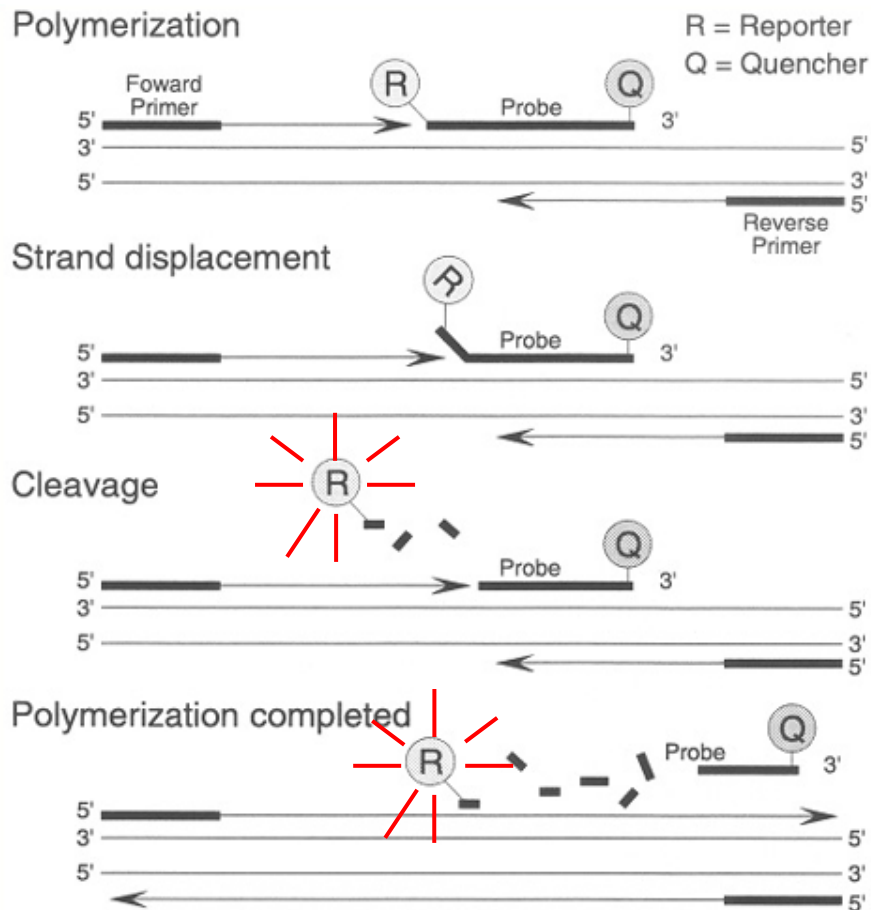
Kälteschock auf Eis

### 3.3.1.3 Quantitative *Realtime* PCR mit TaqMan Sonden

Die quantitative *Realtime* PCR ist eine PCR Methode, bei der die produzierte DNA nach jedem Zyklus (in Echtzeit) quantifiziert wird. Die hierbei eingesetzte *TaqMan* Sonde besteht aus ssDNA und bindet die Zielsequenz spezifisch zwischen Fwd und Rev *Primer*. Am 5' Ende der Sonde befindet sich ein Reporter und am 3' Ende ein Quencher. Bei intakten Sonden wird die Reporterfluoreszenz, durch fluoreszenzfreie Energieübertragung (Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer, FRET), vom Quencher unterdrückt. Während der Elongationsphase wird die Sonde durch die 5'-3'-Exonucleaseaktivität der Polymerase abgebaut. Aufgrund der fehlenden räumlichen Nähe wird die Reporterfluoreszenz nicht mehr

## Methoden

gehemmt. Die Fluoreszenz nimmt dadurch proportional zur produzierten Zielsequenz zu und wird am Ende eines jeden Zyklus vom Cycler detektiert. Die in dieser Arbeit verwendeten ANXA2 Sonden beinhalten den Reporterfarbstoff FAM und den Quencherfarbstoff TAMRA. Der Ablauf der *Realtime* PCR ist in Abb. 15, das Pipettierschema in Tab. 8 dargestellt.



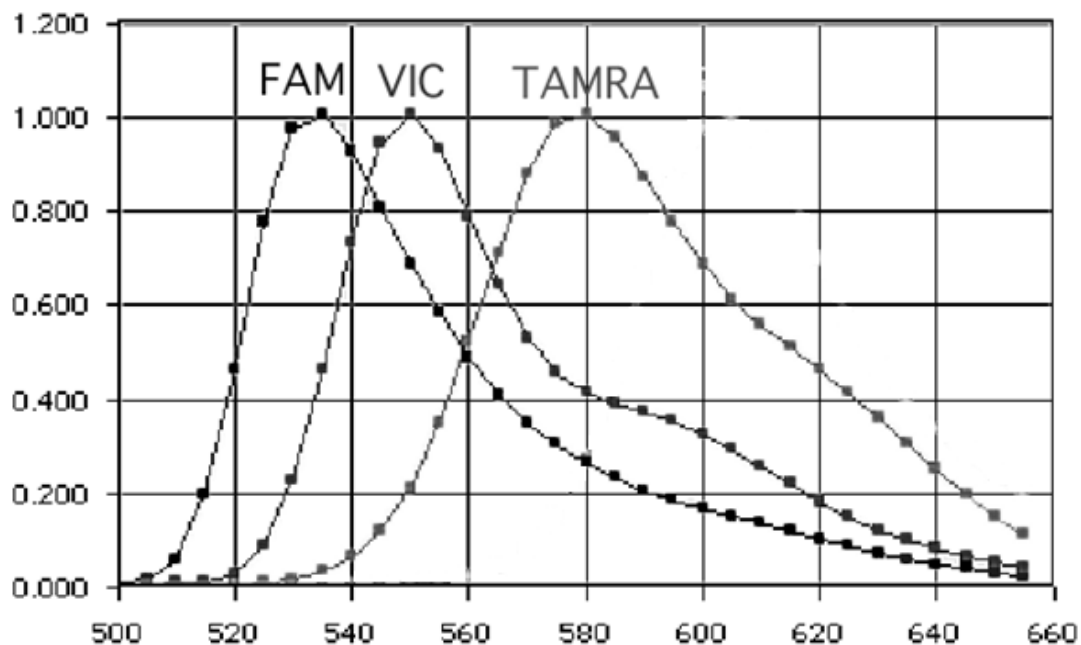
**Abb. 15. Ablauf der Realtime PCR**

Abbildung wurde von der Website von SHANGHAI HUAGUAN BIOCHIP CO.,LTD über Quantitative *Realtime* PCR modifiziert übernommen.

**Tab. 8. Pipettierschema der TaqMan Ansätze**

	µl/Ansatz
Sonde/Primer	0,75
GAPDH	0,75
H <sub>2</sub> O	5,5
MM	7,5
DNA	0,5

Als interne Referenz wurde in jeder Probe eine GAPDH Sonde verwendet. Anstatt FAM dient hier VIC als Reporterfarbstoff. Aufgrund der unterschiedlichen Extinktionsbereiche der beiden Farbstoffe (Abb. 16) können diese gleichzeitig nach jedem Zyklus detektiert werden. Die Auswertung der *TaqMan*-Analyse erfolgte durch die 7500 Fast System SDS Software und der  $\Delta\Delta C_t$  Methode [142].



**Abb. 16. Extinktionsbereiche der Farbstoffe FAM, VIC und TAMRA**

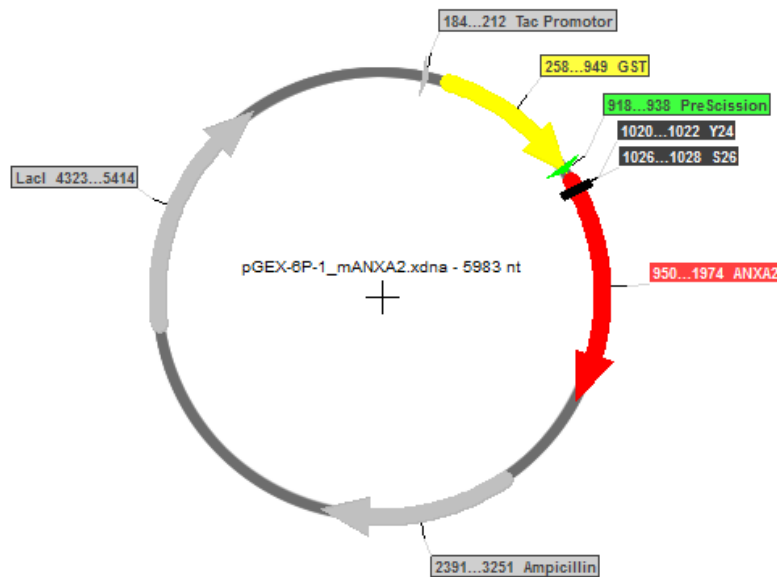
Verändert übernommen aus dem Datenblatt von ABI PRISM®, 7700 Sequence Detection System© Copyright 2001 von Applied Biosystems.

### 3.3.2 Klonierung und Vektorwahl

Bevor die Proteine ANXA2, ANXA2\_Y24D, ANXA2\_S26D und P11 hergestellt werden können, müssen die entsprechenden Sequenzen kloniert werden. Die Klonierung dient der exponentiellen Vervielfältigung von ausgewählten DNA-Fragmenten. Dazu werden sie in Plasmidvektoren mit besonderen Eigenschaften integriert. Für diese Arbeit wurde der Vektor, pGEX-6P-1 gewählt (Abb. 17). Da er für eine Ampicillinresistenz kodiert, können Bakterien, die den Vektor aufgenommen haben von untransformierten Bakterien unterschieden werden. Die Strukturgene werden von einem Tac Promotor reguliert, sodass durch Induktion mit IPTG alle transformierten Bakterien gleichzeitig das jeweilige Strukturgen produzieren. Durch Insertion der Strukturgene direkt hinter den *open reading frame* der GST, produzieren die Bakterien ein Fusionsprotein.

## Methoden

Daher können die rekombinant hergestellten Proteine später über Glutathion Beads aufgereinigt werden.



### Abb. 17. pGEX-6P-1 Vektor mit integriertem ANXA2

Die Abbildung zeigt den pGEX-6P-1 Vektor mit integriertem Strukturprotein (rot) direkt hinter dem *open reading frame* von GST (gelb) am Beispiel von ANXA2. Dazwischen befindet sich die Schnittstelle für die PreScission Protease (grün). Die Mutationsstellen am Y24 und S26 sind schwarz hervorgehoben. Der *open reading frame* für die beta-Lactamase (Ampicillinresistenz), für den Repressor LacI und den Tac Promotor sind grau unterlegt.

### 3.3.2.1 Primerdesign

Der erste Schritt zur Herstellung eines GST Fusionsproteins ist das Design von *Primern*, welche zu einer spezifischen Amplifizierung des gewünschten Genabschnittes in der PCR führen. Für die spätere Ligation dieses PCR Produktes in den pGEX-6P-1 Vektor müssen zusätzlich spezifische Restriktionsschnittstellen eingefügt werden. Als Vorlage für das *Primerdesign* für ANXA2 wurde die NCBI Referenzsequenz NM 007585.3, für P11 die NM 009112.2 verwendet. Alle *Primer* beinhalten eine Sequenz des kodierenden und des nicht kodierenden Genabschnittes. Diese sind durch eine Restriktionsschnittstelle getrennt (Abb. 18). Im Fwd *Primer* wurde die Schnittstelle für das Restriktionsenzym direkt vor das Startcodon gesetzt, im Rev *Primer* direkt hinter die kodierende Sequenz. Zusätzlich beinhaltet der Rev *Primer* vor der Restriktionsenzym- (RE) schnittstelle ein Stoppcodon um eine korrekte Termination zu bewirken. Der Fwd



*Primer* für ANXA2 beinhaltet eine BamHI Schnittstelle, der für P11 eine EcoRI Schnittstelle. Die *Rev Primer* enthalten eine NotI Schnittstelle, welche durch den Einbau von zwei zusätzlichen Nukleotiden *in frame* gebracht wurde.

**Fwd *Primer* ANXA2: NCBI Referenzsequenz: NM 007585.3**

TTTTTTTTTC GGATCC ATGTCTACTGTCCACGAAATCC  
 5' GST. . . UTR ANXA2 BamHI ANXA2 Start 3'

**Rev *Primer* ANXA2**

ATCCAAGTGT GCGGCCGC CT TCAGTCATCCCCACCAACACA  
 5' UTR ANXA2 NotI ANXA2 mit Stopp . . . GST 3'

**Fwd *Primer* P11: NCBI Referenzsequenz: NM 009112.2**

CGACAGACTC GAA TTC ATGCCATCCCAAATGGAGCA  
 5' GST. . . UTR P11 ECO RI P11 Start 3'

**Rev *Primer* P11**

TACCAGTGC GCGGCCGC GC CTAATTCTCCCCTTCTGCT  
 5' UTR AQP2 NotI P11 mit Stopp . . . GST 3'

**Abb. 18. Darstellung der *Primer*-Sequenzen für die Expression der Fusionsproteine ANXA2-GST und P11-GST**

Die Restriktionsschnittstellen sind in rot, die UTR in grau und die kodierenden Sequenzen in schwarz dargestellt. Das GST liegt N-terminal.

Um ein Protein herzustellen, das die natürlich vorkommenden Phosphorylierungen von ANXA2 imitiert, wurden *Primer* generiert, die sich über den Bereich der beiden phosphorylierbaren Aminosäuren, Y24 und S26 erstrecken. Im ersten *Primer*-Paar wurde das Kodon TAC, welches für die Aminosäure Tyrosin an Stelle 24 kodiert durch das Kodon GAC, welches für die Aminosäure Asparaginsäure kodiert ausgetauscht. Im zweiten *Primer*-Paar wurde das Kodon TCA, welches für die Aminosäure S26 kodiert, ebenfalls durch GAC ausgetauscht. Um die Bindung dieser *Primer* an ihr *Template* trotz des

## Methoden

inkompatiblen Kodons zu unterstützen, enthalten die *Primer* jeweils 12 spezifische Basenpaare vor und nach der Mutation (Abb. 19).

Die so generierten *Primer* wurden bei der Firma Metabion bestellt.

### **ANXA2: Aminosäuresequenz und Codons 20-31**

Aminosäure	20	21	22	23	Y24	25	S26	27	28	29	30	31
132	CCC	CCA	AGT	GCC	TAC	GGG	TCA	GTC	AAA	CCC	TAC	ACC

#### **Primer ANXA2\_Y24D**

Fwd: 5' CCC CCA AGT GCC **GAC** GGG **TCA** GTC AAA CCC TAC ACC 3'  
Rev: 5' GGT GTA GGG TTT **GAC** TGA **CCC** GTC GGC ACT TGG GGG 3'

#### **Primer ANXA2\_S26D**

Fwd: 5' CCC CCA AGT GCC **TAC** GGG **GAC** GTC AAA CCC TAC ACC 3'  
Rev: 5' GGT GTA GGG TTT **GTC** TGA **GTA** GTC GGC ACT TGG GGG 3'

### **Abb. 19. Darstellung der Mutations-Primer für die Expression der Fusionsproteine ANXA2\_Y24D-GST und ANXA2\_S26D**

Das jeweils mutierte Codon ist in rot, das WT Codon in grau dargestellt.

### **3.3.2.2 PCR**

Die PCR dient der exponentiellen Vervielfältigung von genau definierten DNA-Fragmenten, wobei die Produkte eines Zyklus die Matritze für die folgenden Zyklen darstellt. Die hier verwendeten *Primer* für ANXA2 und P11 umspannen die gesamte kodierende mRNA Sequenz.

Die PCR findet in einem Thermocycler statt, der die verschiedenen Temperaturen, die für jeden der drei PCR-Schritte unterschiedlich ist, generiert. Bei 95°C denaturiert die dsDNA, sodass *Primer*, welche je nach ihrer Länge und Komposition eine spezifische Bindetemperatur besitzen an die DNA binden können. Die Polymerase verlängert den *Primer* während der Elongationsphase mit den bereitgestellten dNTPs nach Vorlage der Matritze. Als Template für die ANXA2 PCR wurde der pCMV-Sport\_mANXA2 Vektor von ImaGenes verwendet. Für die P11 Synthese diente cDNA aus murinen Sammelrohrzellen als Vorlage.

Das exakte Pipettierschema sowie eine Auflistung der PCR Programme sind in Tab. 9 und Tab. 10 dargestellt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die TaqPolymerase für Kontrollversuche und die Phusion Polymerase mit Proofreadingfunktion für Klonierungen verwendet.

**Tab. 9. PCR Programme**

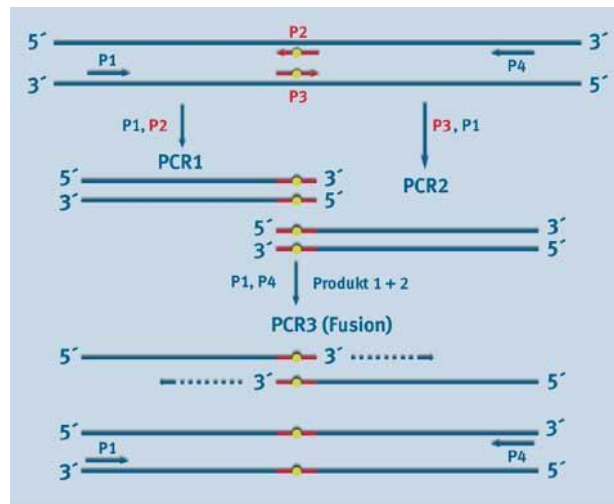
	<b>PCR Programm</b>	<b>Taq</b>		<b>Phusion</b>	
1	Denaturierung	94°C	5 min	98°C	2 min
2	Denaturierung	94°C	1 min	98°C	40 sec
3	<i>Primer_Annealing</i>	60°C	30 sec	49°C	30 sec
4	Elongation	72°C	1 min	72°C	50 sec
5	Elongation	72°C	7 min	72°C	5 min
		30 Zyklen von 2-4		35 Zyklen von 2-4	

**Tab. 10. Pipettierschema der PCR-Ansätze**

<b>Pipettierschema</b>	<b>Taq</b> µl/Ansatz	<b>Phusion</b> µl/Ansatz
MilliQ	12,4	12,9
HF Puffer	5	4
10mM dNTPs	2	0,4
MgCl <sub>2</sub>	2	-
<i>Primer A</i>	1,25	1
<i>Primer B</i>	1,25	1
Template	1	0,5
pFU	0,1	0,2

### 3.3.2.3 *Overlap-Extension-PCR zur zielgerichteten Mutagenese*

Für die zielgerichtete Mutation von ANXA2, also für den Austausch von Y24 oder S26 zu D, wurden drei PCRs durchgeführt (Abb. 20). In der ersten PCR wurde der Fwd *Primer* von ANXA2 und der Rev *Mutations-Primer* verwendet (siehe *Primerdesign*). So entstand ein ca. 110bp großes Fragment welches die Mutation beinhaltetete. In der zweiten PCR wurde der Rev *Primer* von ANXA2 und der Fwd *Mutations-Primer* verwendet. Hier entstand ein ca. 635bp großes Fragment, das ebenfalls die Mutation beinhaltete. Aufgrund der komplementären *Mutations-Primer* führte die Vereinigung der beiden PCR Produkte zur Hybridisierung. Das Produkt diente als Template für die dritte PCR in der mithilfe der Fwd und Rev *Primer* das vollständige Genprodukt für ANXA2\_Y24D oder ANXA2\_S26D produziert wurde.



**Abb. 20. Schematische Darstellung der *Overlap-Extension-PCR***

Die Abbildung wurde von Gabriele Grabowski aus dem Laborjournal online „Mutieren, bis der Thermocycler glüht“, übernommen. Die Fwd und Rev *Primer* sind in blau, die Mutations-*Primer* in rot dargestellt.

### 3.3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient zur Auftrennung von DNA- oder RNA-Fragmenten aufgrund ihrer Molekülgröße. Dazu wird ein Agarosegel mit TAE Puffer überschichtet, die DNA mit glycerinhaltigem Ladepuffer vermengt und in gelfreie Taschen gefüllt. Das Glycerin sorgt für ein Absinken der DNA auf den Grund der Geltasche. Nach Anlegen einer elektrischen Spannung wird die negativ geladene DNA von der Kathode angezogen, wobei kleinere Fragmente schneller durch die Poren aus Agarosepolymeren gelangen als große. So wird die DNA nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Die hier verwendeten Agarosegele enthielten 1-2% Agarose und 0,01 % Vol SYBR Safe DNA gel stain. Mit Hilfe dieses nukleinsäure-färbenden Stoffes sind die aufgetrennten DNA Banden auf einem UV-Tisch sichtbar. Um die Größe der einzelnen Banden abschätzen zu können wurde der GeneRuler von Fermentas, welcher DNA Fragmente mit distinkter Größe enthält mit auf das Gel aufgetragen.

#### **TAE Puffer (50x)**

242g Tris Base  
 57,1ml Eisessig  
 100ml 0,5molare EDTA-Lösung  
 (pH 8,0)

### 3.3.2.5 Gelextraktion von PCR Produkten

Die Extraktion und Aufreinigung von Vektoren und PCR Produkten aus einem Agarosegel erfolgte nach Herstellerangaben mit einem DNA Extraction Kit von der Firma Stratec. Die Elution fand stets in MilliQ statt.

### 3.3.2.6 Restriktionsverdau von Plasmiden und PCR Produkten

Damit Bakterienzellen ein PCR Produkt aufnehmen und es vervielfältigen bzw. in Protein umschreiben, muss es zuerst in ein Plasmid integriert werden. Kommerziell erhältliche Plasmide enthalten meist eine multiple cloning site, die Restriktionsschnittstellen für verschieden RE enthält, sodass ein PCR Produkt gezielt integriert werden kann. Um später bei der Ligation ein optimales Verhältnis von 3-5-mal mehr Insert im Vergleich zu Plasmid zu erzielen, wurden 0,35 µg PCR Produkt und pGEX-6P-1 Plasmid in einem separaten 30 µl Ansatz mit den entsprechenden RE für drei Stunden bei 37°C verdaut (Tab. 11). Der (2x) Tango Puffer war für alle RE geeignet, von denen jeweils 5 Units im Doppelverdau eingesetzt wurden. Werden zwei Fragmente mit dem gleichen RE Enzym geschnitten, so entstehen komplementäre Enden, die ligieren können. Um zu verhindern, dass Plasmide, die nur von einem der beiden RE geschnitten wurden, später religieren, wurden sie im Anschluss 30 Min bei 37°C mit *Calf Intestine* Phosphatase inkubiert. Diese katalysiert die Abgabe der 5´Phosphatgruppe vom verdauten Vektor.

**Tab. 11. Zuordnung der RE für den Doppelverdau von PCR Produkten und Plasmiden**

	BamHI	NotI	EcoRI	NotI
ANXA2	x	x		
ANXA2_Y24D	x	x		
ANXA2_S26D	x	x		
pGEX-6P-1 für ANXA2	x	x		
P11			X	X
pGEX-6P-1 für P11			X	X

### **3.3.2.7 Ligation von Plasmiden und PCR Produkten**

Da der verwendete Vektor ca. fünfmal größer ist als das Insert, wurden für die Ligation gleiche Massenverhältnisse von beiden gelelektrophoretisch aufgereinigten Produkten verwendet (siehe 3.3.2.4; 3.3.2.5). Die Inkubationszeit im 27 µl Ansatz mit 1 µl T4 Ligase im T4 Ligase Puffer betrug vier Stunden bei RT oder ü.N. bei 16°C. Als Ligationskontrolle wurde ein Ansatz mit verdautem Vektor ohne Insert verwendet. So lässt sich nach Transformation von Bakterienzellen die Frequenz der falschpositiven Klone abschätzen.

## **3.4 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN**

### **3.4.1 Herstellung kompetenter E.coli Stämme**

Die in dieser Arbeit verwendeten E.coli Stämme, Top.10 und Rosetta, besitzen keinen kompletten Satz an Kompetenzgenen. Sie können aber mithilfe von Kalziumchlorid chemisch kompetent gemacht werden. Dazu wurde ein Verdünnungsausstrich auf Agarplatten ohne Selektion gemacht, jeweils fünf Klone gepickt und in LB Medium vervielfältigt. Bei einer optischen Dichte von 0.6-0.7 bei einer Wellenlänge von 600 nm wurden die Zellen bei 2200xg und pelletiert und in 100mM eiskaltem CaCl<sub>2</sub> eluiert.

### **3.4.2 Transformation von kompetenten Bakterien mit rekombinanten Plasmiden**

Es wurden 200 µl kompetente Zellen mit dem gesamten Ligationsansatz versetzt und für 30 Min auf Eis aufgetaut. Durch das CaCl<sub>2</sub> erhöht sich die Wahrscheinlichkeit der räumlichen Nähe von negativ geladener DNA und äußerer Bakterienmembran. Der einminütige Hitzeschock bei 42°C verstärkt die Molekülbewegungen. Wahrscheinlich entstehen hierbei Poren in der Bakterienmembran. Das führt zur verstärkten Aufnahme von Plasmiden. Nach einer zweiminütigen Abkühlzeit auf Eis wurden die Bakterien zusammen mit 200 µl LB Medium ohne Selektion bei 37°C geschüttelt. In dieser Zeit produzieren transformierte Bakterien die auf dem pGEX-6P-1 Plasmid kodierte Beta-Laktamase und entwickeln somit eine Resistenz gegen Ampicillin. Der gesamte

Ansatz wurde anschließend auf ampicillinhaltigen Agarplatten ausgestrichen und ü.N. bei 37°C inkubiert.

**LB Medium**

5 g Bacto Hefe

10 g Bacto-Trypton

10 g NaCl

Für Agarplatten 15 g Agar dazu

Für Selektion 100 µg/ml Ampicillin dazu

Mit NaOH auf pH 7 einstellen und auf einen Liter auffüllen

**3.4.3 Plasmid Präparation**

Für die exponentielle Vervielfältigung von rekombinant hergestellten Plasmiden wurden einzelne Klone gepickt (siehe 2.4.2) und in einer ü.N.-Kultur in ampicillinhaltigem LB Medium vermehrt. Die anschließende Plasmidisolation basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen und der Bindung von Plasmiden auf der Oberfläche von Spin Filtern. Dabei sorgt Kaliumazetat für ein Präzipitieren von genomischer DNA, sodass spezifisch die Plasmid DNA gewonnen wird. Sowohl die Mini- als auch die Maxipräparation wurden nach Anleitung der Kits von Machery Nagel und Stratec durchgeführt.

Die gewonnenen Konstrukte wurden durch den Sequenzierservice der Dr. Martin Meixner GmbH in Berlin sequenziert. Die Auswertung dieser Daten erfolgten mit der Sequence Scanner v1.0 Software und der Blast Funktion der Website, NCBI. Alle Plasmide und DNA Konstrukte wurden mit der Serial Cloner 2.1 Software verwaltet.

**3.5 STATISTIK**

Alle statistisch ausgewerteten Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt. Mithilfe von Microsoft Excel 2010 und SPSS wurde aus diesen Einzelmessungen das arithmetische Mittel, die Standardabweichung und die Signifikanz des Ergebnisses mittels t-Test für unabhängige Stichproben oder mittels Mann-Whitney-U-Test berechnet. Signifikante Ergebnisse mit  $p \leq 0,05$  sind mit \* gekennzeichnet.

## Methoden

### **Arithmetisches Mittel:**

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_n}{n}$$

### **in %:**

*Kontrollgruppe = 100%*

*$\frac{\text{behandelte Gruppe} * 100}{\text{Mittelwert Kontrollgruppe}}$*

*Mittelwert Kontrollgruppe*

### **Empirische Standardabweichung:**

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

### **in %:**

*$\frac{\text{Standardabweichung} * \text{Mittelwert in \%}}{\text{Mittelwert}}$*

*Mittelwert*



## 4. ERGEBNISSE

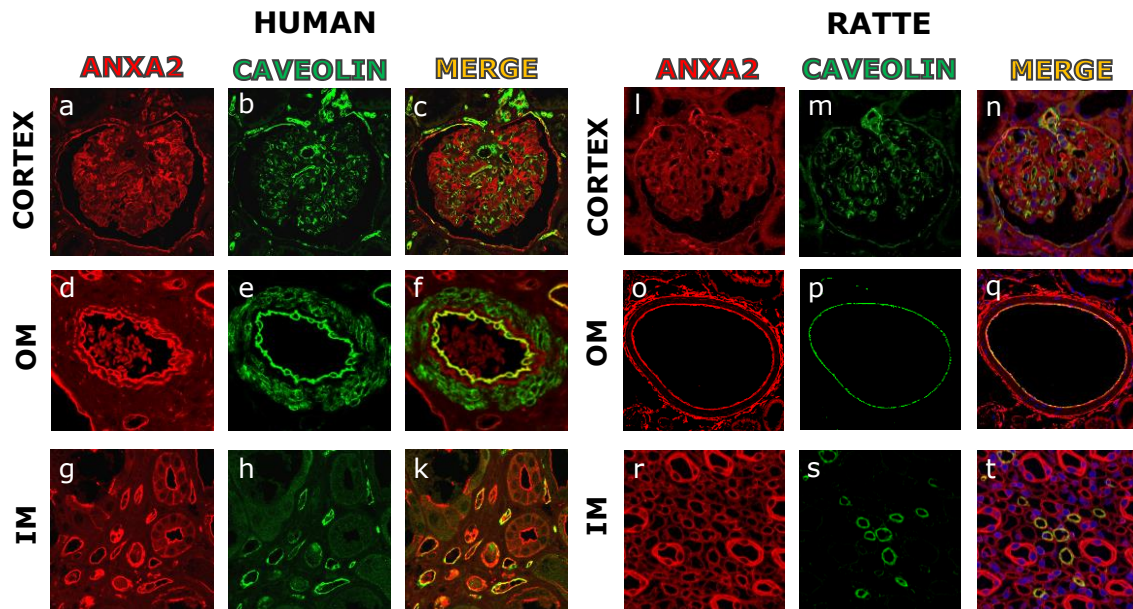
### 4.1 ANXA2 LOKALISATION IN DER NIERE

ANXA2 wurde bereits in Endothelien und verschiedenen nierenspezifischen Zelltypen beschrieben [8, 118, 143-147]. Eine umfassende, spezieübergreifende Lokalisationsstudie von ANXA2 in gesunden Nieren existiert aber bisher nicht. In dieser Arbeit wurde die Lokalisation von ANXA2 in der Niere von Mensch, Ratte und Maus charakterisiert.

#### 4.1.1 ANXA2 Lokalisation in renalen Gefäßen

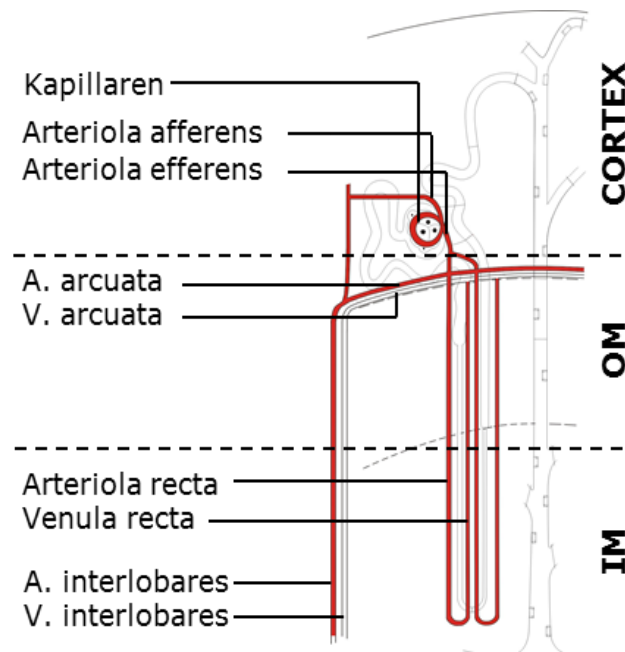
Durch Inkubation von Paraffinschnitten aus Nierengewebe von Menschen und Long-Evans Ratten mit dem Endothelmarker anti-Caveolin-1 [148, 149], wurden alle nierenspezifischen Gefäße markiert. Diese Färbung ist in grün dargestellt (Abb. 21). Die Markierung mit einem ANXA2-Antikörper, der bereits in verschiedenen immunhisto- bzw. immunzytologischen Untersuchungen verwendet wurde [150-152], zeigte die Lokalisation von ANXA2. Diese Färbung ist in rot dargestellt (Abb. 21). Durch histologische Auswertung der ko-markierten Strukturen konnten ANXA2-positive Gefäßabschnitte identifiziert werden. Im Cortex sind die afferente Arteriole, die efferente Arteriole und die Kapillaren im Glomerulum positiv für ANXA2 (Abb. 21a-c, l-n). In der äußeren Medulla sind die Arteriae arcuatae (Abb. 21d-f, o-q), in der inneren Medulla die Vasa recta und im Bereich der Nierenrinden-Markgrenze die Arteriae interlobares positiv für ANXA2 (Abb. 21o-k, r-t). Die gleichen Ergebnisse wurden mit einem zweiten ANXA2-Antikörper generiert (hier nicht gezeigt).

Wie erwartet exprimieren fast alle renalen Gefäße ANXA2. Ausnahmen bilden die größeren Venen, Venae arcuatae und Venae interlobares. Diese Ergebnisse sind im Menschen und der Ratte identisch. Eine Zusammenfassung ist schematisch in Form einer Übersicht aller ANXA2-positiven Gefäßabschnitte der Niere in Abb. 22 dargestellt.



**Abb. 21. Lokalisation von ANXA2 in renalen Gefäßen**

Doppelmarkierungen mit dem Endothelmarker anti-Caveolin-1 (grün) und anti-ANXA2 (rot) auf Paraffinschnitten aus humanem und Long-Evans Ratten Nierengewebe, lokalisieren ANXA2 auf Endothelien. Im Cortex sind sowohl die afferente und efferente Arteriole als auch die Kapillaren des Glomerulums positiv für ANXA2 (a,l). In der äußeren Medulla (OM) sind die Arteriae arcuatae positiv für ANXA2 (d,o). In der inneren Medulla (IM) sind die Arteriolen recta und in der Nierenrinden-Markgrenze die Arteriae interlobares positiv für ANXA2 (g,r).



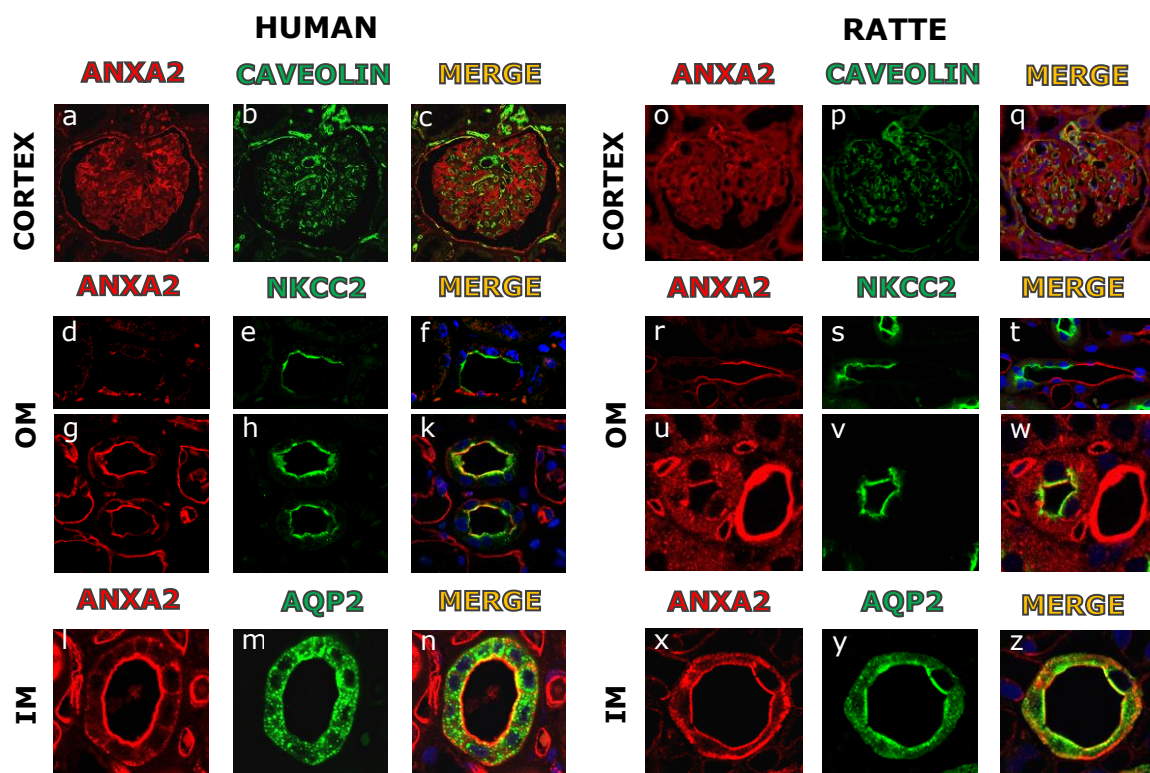
**Abb. 22. Schematische Übersicht von ANXA2 in renalen Gefäßen**

Die schematische Darstellung der renalen Gefäße fasst die ANXA2-positiven Abschnitte (rot) zusammen. Im Cortex sind sowohl die afferente und efferente Arteriole als auch die Kapillaren des Glomerulums positiv für ANXA2. In der äußeren Medulla (OM) sind die Arteriae arcuatae positiv und die Venae arcuatae negativ für ANXA2. In der inneren Medulla (IM) sind die Vasa recta positiv und im Bereich der Nierenrinden-Markgrenze sind die Arteriae interlobares positiv, die Venae interlobares negativ für ANXA2.

#### 4.1.2 ANXA2 Lokalisation in renalen Tubulusabschnitten

Die verschiedenen renalen Tubulusabschnitte wurden anhand von Paraffinschnitten aus Nierengewebe von Menschen und Long-Evans Ratten mit spezifischen Antikörpern markiert und durch zusätzliche morphologische Kriterien identifiziert. Der Endothelmarker anti-Caveolin-1 markiert alle Gefäße [148, 149] (Abb. 23b,p), anti-NKCC2 markiert die dicke aufsteigende Henle Schleife [153, 154] (Abb. 23e,h,s,v) und anti-AQP2 markiert das Sammelrohr [155, 156] (Abb. 23m,y). Eine zusätzliche Inkubation der Paraffinschnitte mit dem ANXA2-Antikörper zeigt die Lokalisation von ANXA2 (Abb. 23 rot). Im Cortex finden sich neben ANXA2-positiven Kapillaren weitere ANXA2-positive Zellen. Hierbei handelt es sich um Mesangialzellen. Weiterhin ist die äußere Membran der Bowmankapsel positiv für ANXA2 (Abb. 23a-c, o-q). In der äußeren Medulla grenzen ANXA2-positive Abschnitte an NKCC2-positive Abschnitte an (Abb. 23d-f, r-t). Hierbei handelt es sich um die dünne Henle Schleife. Auch die dicke aufsteigende Henle Schleife ist positiv für ANXA2 (Abb. 23g-k, u-w). Im Bereich der inneren Medulla sind die Hauptzellen des Sammelrohrs ANXA2-positiv (Abb. 23l-n, x-z). Die gleichen Ergebnisse wurden mit einem zweiten ANXA2-Antikörper generiert (hier nicht gezeigt).

Die ANXA2-positiven Tubulusabschnitte sind im Menschen und der Ratte identisch. Eine Zusammenfassung ist in Abbildung 25 dargestellt.

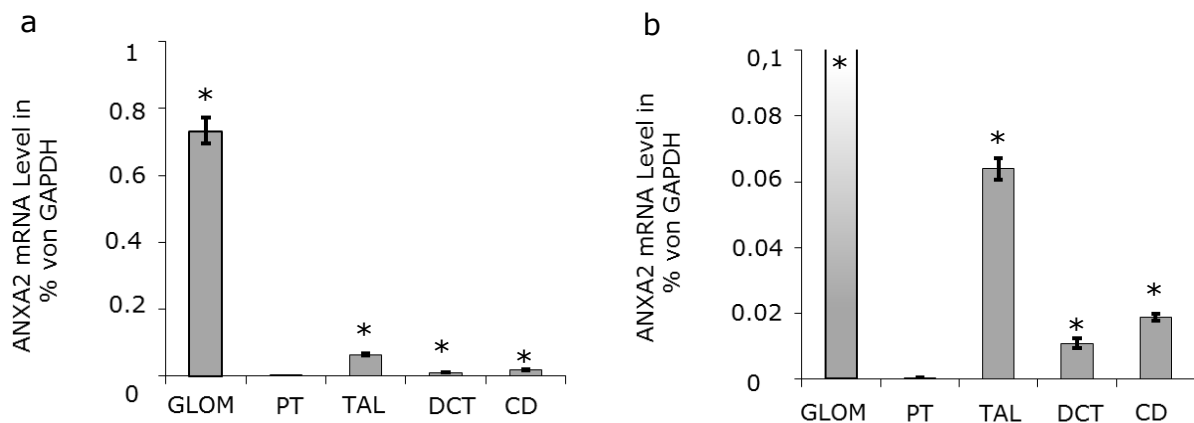


**Abb. 23. Lokalisation von ANXA2 in renalen Tubulusabschnitten**

Doppelmarkierungen mit dem Endothelmarker anti-Caveolin-1 (b,p), dem Marker der dicken aufsteigenden Henle Schleife anti-NKCC2 (e,h,s,v), dem Sammelrohrmarker anti-AQP2 (l,x) und anti-ANXA2 (rot) auf Paraffinschnitten aus Nierengewebe von Menschen und Long-Evans Ratten lokalisieren ANXA2 in unterschiedlichen nierenspezifischen Zelltypen. Im Cortex (Abb. a-c, o-q) sind Mesangialzellen und die äußere Wand der Bowmankapsel positiv für ANXA2. In der äußeren Medulla (OM) ist die dünne absteigende und aufsteigende Henle Schleife (Abb. d-f, r-t) und die dicke aufsteigende Henle Schleife (Abb. g-k, u-w) positiv für ANXA2. In der inneren Medulla (IM) (Abb. l-n, x-z) sind die Hauptzellen des Sammelrohrs ANXA2-positiv.

**4.1.3 ANXA2 Expression in renalen Tubulusabschnitten**

Zur Verifikation der Immunhistologie wurden die mRNA-Spiegel von ANXA2 in renalen Tubulusabschnitten gemessen. Soweit morphologisch möglich, sortierte Dr. Nina Himmerkus - AG Prof. Bleich, verschiedene Abschnitte des renalen Tubulussystems aus Nieren von C57 / Black 6 Mäusen, per Hand. Die Ermittlung der mRNA-Spiegel von ANXA2 erfolgte mittels *Realtime* PCR und *TaqMan*-Sonden. Als endogene Kontrolle wurde das Referenz-Gen GAPDH verwendet. Abbildung 24 zeigt die ANXA2-Expression im Glomerulum, im proximalen Tubulus, in der dicken aufsteigenden Henle Schleife, im distalen Konvolut und im Sammelrohr im normalen (a) und im verringerten Maßstab der Y-Achse (b). Das Glomerulum, in dem sich hauptsächlich Endothelien befinden, exprimiert ANXA2 am stärksten. Im Vergleich zum proximalen Tubulus, der selbst kein ANXA2 exprimiert, weisen alle anderen untersuchten Abschnitte signifikante Expressionen von ANXA2 auf. Die Zusammenfassung der Expressionsdaten und der Histologie ist in Abbildung 25 dargestellt.



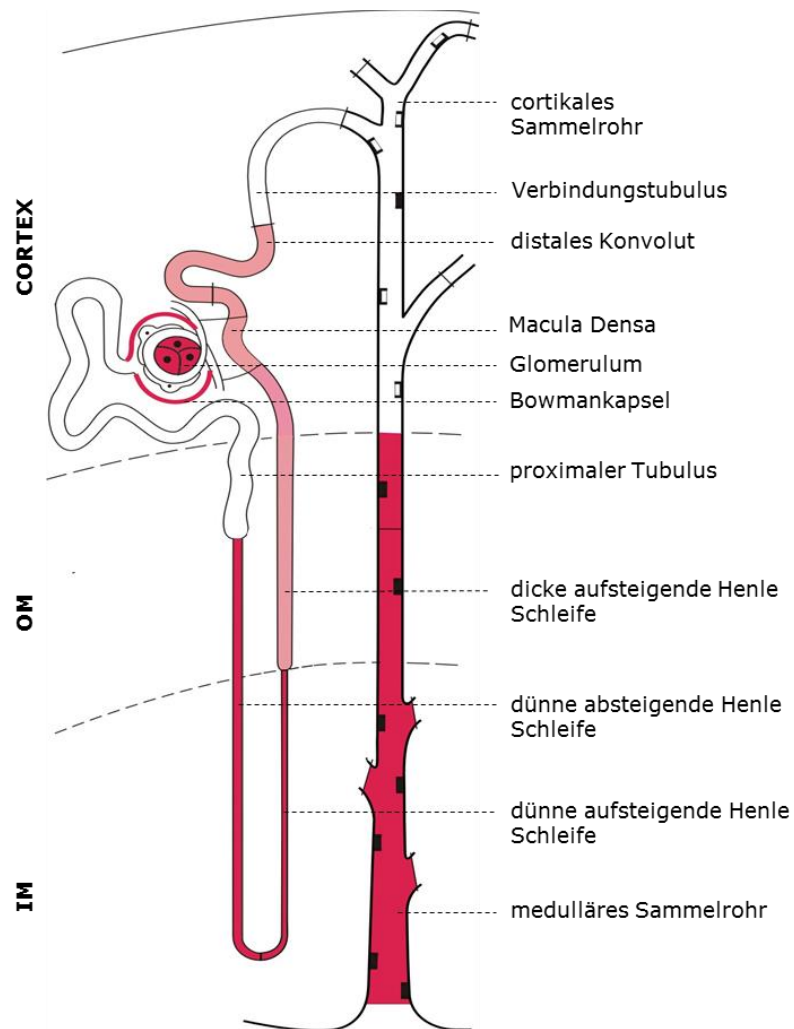
**Abb. 24. ANXA2 Expression in renalen Tubulusabschnitten**

Die ANXA2 mRNA-Expression wurden mittels *TaqMan*-Analyse aus mikrodissizierten Tubulusabschnitten von C57/Bl6 Mäusen untersucht. Das Säulendiagramm fasst die Ergebnisse aus drei Experimenten zusammen. Die ANXA2 mRNA-Spiegel sind prozentual im Vergleich zur internen GAPDH Kontrolle zu sehen. Im Vergleich zum proximalen Tubulus weisen alle anderen dargestellten Tubulusabschnitte signifikante ANXA-mRNA-Spiegel auf. a) Ergebnisse der *TaqMan*-Analyse im normlen b) im verringerten Maßstab der Y-Achse. GLOM: Glomerulum, PT: proximaler Tubulus, TAL: dicke aufsteigende Henle Schleife, DCT: distales Konvolut, CD: Sammelrohr

#### **4.1.4 Zusammenfassung der Lokalisation von ANXA2 in den renalen Tubulusabschnitten**

Mittels Immunhistologie und Expressionsanalyse wurde eine umfassende Lokalisationsstudie von ANXA2 in gesunden Nieren von Mensch, Ratte und Maus durchgeführt. Die immunhistologische Untersuchung detektierte ANXA2 in Mesangialzellen, der äußeren Wand der Bowmankapsel, der Henle Schleife, der Macula densa und dem medullären Sammelrohr. Die Expressionsanalyse bestätigte die glomerulären Zellen, die dicke Henle Schleife und das Sammelrohr. Zusätzlich zeigte sie die ANXA2-mRNA-Expression im distalen Konvolut. Beide experimentellen Ansätze lokalisieren ANXA2 also weitgehend in den gleichen Tubulusabschnitten. In Abbildung 25 sind die Ergebnisse beider Ansätze zusammengefasst. Da die ANXA2-Spiegel in der Expressionsanalyse aber von der immunhistologischen Auswertung abweichen, bezieht sich die Farbintensität auf das tatsächliche Proteinvorkommen, also die histologische Auswertung. Rote Färbung markiert eine starke, rosa Färbung eine schwache und weiße Färbung kein ANXA2-Vorkommen in den einzelnen Tubulusabschnitten.

Die Lokalisationsstudie zeigt, dass die ANXA2-positiven Tubulusabschnitte in Mensch, Ratte und Maus identisch sind. Auch im Sammelrohr, in dem ANXA2 an der Translokation von AQP2 beteiligt sein soll, ist es in allen drei Spezies vorhanden.



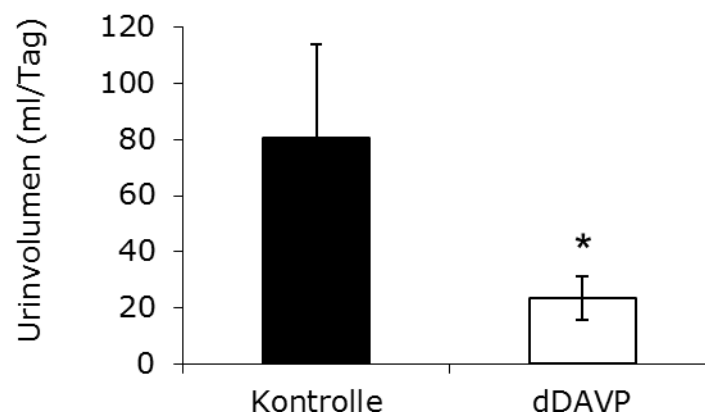
**Abb. 25. Schematische Übersicht von ANXA2 in renalen Tubulusabschnitten**

Die schematische Darstellung fasst die Ergebnisse der histologischen Auswertung und Expressionsanalyse von ANXA2 zusammen. Rot gefärbte Tubulusabschnitte zeigen eine starke, rosa eingefärbte Abschnitte eine schwächere und weiße Abschnitte keine ANXA2-Expression. Im Cortex sind im Bereich des Nierenkörperchens die äußere Wand der Bowmankapsel und Mesangialzellen positiv für ANXA2. Weiter distal gelegene Abschnitte sind die Macula Densa und das distale Konvolut. Im Bereich der äußeren Medulla (OM) ist die dünne absteigende Henle Schleife, die dicke aufsteigende Henle Schleife und das Sammelrohr positiv für ANXA2. In der inneren Medulla (IM) sind dünne absteigende und aufsteigende Henle Schleife und die Hauptzellen des Sammelrohrs ANXA2-positiv.

## 4.2 MODELLORGANISMUS BRATTLEBORO RATTE

Die Brattleboro Ratte ist ein hervorragendes Modell um die apikale Translokation von AQP2 gezielt mit dem AVP-Analogen dDAVP zu stimulieren und die am Transport beteiligten Moleküle zu untersuchen. Die Tiere weisen aufgrund der fehlenden AVP-Sekretion eine gestörte Urinkonzentration auf. Sie scheiden mehr als die 10-fache Menge an Urin im Vergleich zu Long-Evans Kontrollratten aus [157]. Die fehlende Stimulation durch AVP verhindert nicht nur die Aktivierung der V2-Rezeptor-Signalkaskade und damit den apikalen Transport des Wasserkanals AQP2. Brattleboro Ratten exprimieren außerdem nur ein Drittel der in Long-Evans Kontrollratten üblichen AQP2-Menge. Werden die Tiere mit dDAVP stimuliert, wird die V2-Rezeptor-Signalkaskade und somit der Urinkonzentrationsmechanismus aktiviert, die ausgeschiedenen Urinvolumina sinken ab, und die AQP2-Abundanz steigt um das Dreifache an [158, 159].

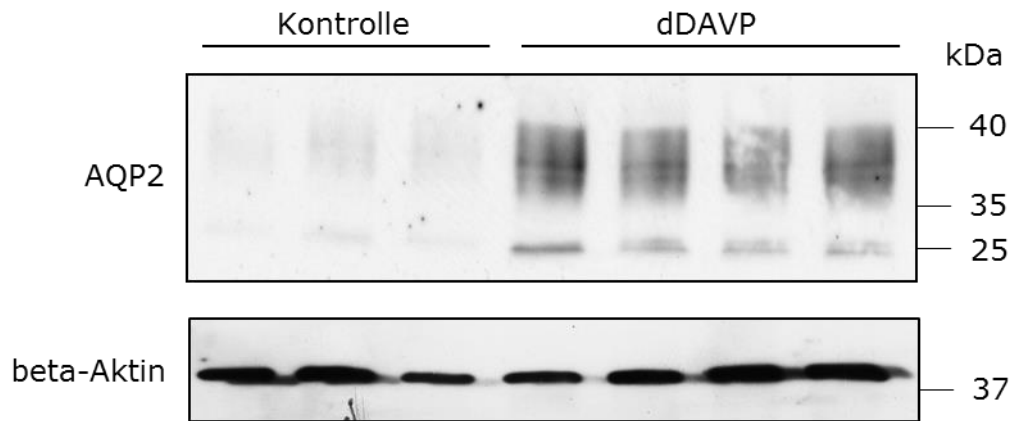
Die in dieser Arbeit analysierten Tiere produzierten Urinvolumina von 80,8 ml +/- 33,2 ml in einem Zeitraum von 24 Stunden (Abb. 26). Nach einer Behandlung mit dDAVP sanken die Werte auf 23,6ml +/- 7,9ml ab. Die *Westernblot*-Analyse von Nierenhomogenaten aus der inneren Medulla dieser Tiere zeigte auch den drastischen Anstieg in der AQP2-Expression, sowohl der glykosylierten Form (35-40 kDa) als auch der nicht glykolysierten Form (29 kDa), nach Behandlung mit dDAVP (Abb. 27).



### Abb. 26. Urinexkretion der Brattleboro Ratte

Die in dieser Arbeit untersuchten Tiere produzierten Urinvolumina von 80,8ml +/- 33,2ml in einem Zeitraum von 24h. Nach einer Behandlung mit dDAVP sanken die Sammelurinwerte auf 23,6 ml +/- 7,9 ml. Die Signifikanz wurde durch den Man Whitney U Test ermittelt. p Value =0,03

## Ergebnisse



### **Abb. 27. AQP2 Expression von dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten**

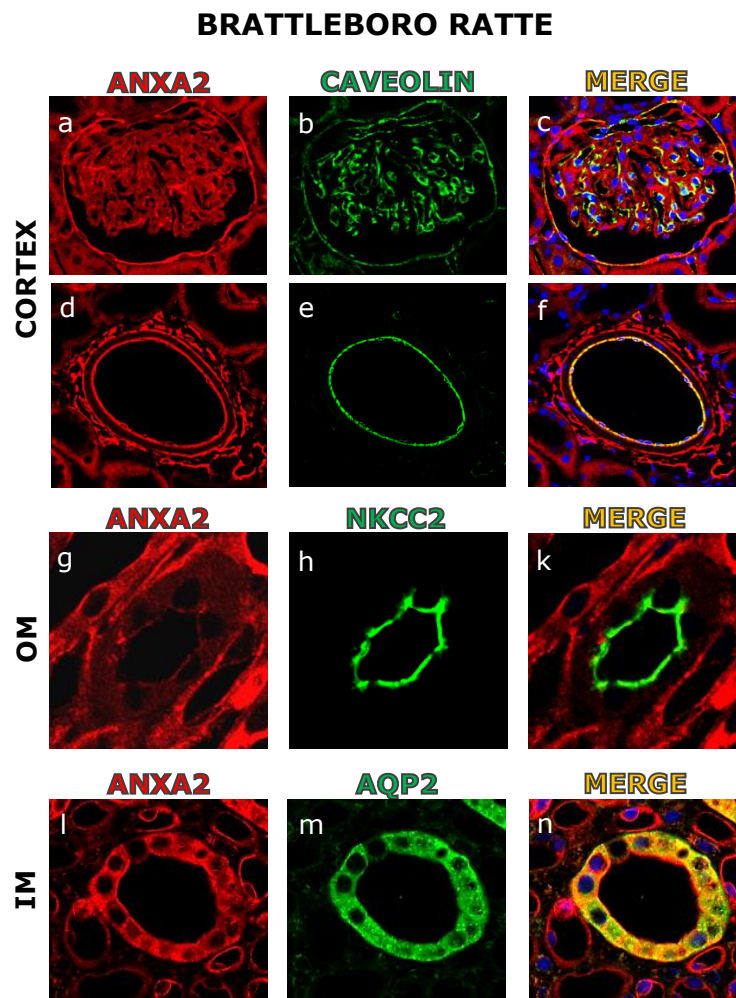
*Western blot*-Analysen aus innermedullären Nierenhomogenaten von Kontroll- und dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten, zeigen einen starken Anstieg der AQP2-Expression nach drei Tagen. Dieser Anstieg ist sowohl bei der nicht glykosylierten Form (29 kDa) als auch bei der glykosylierten Form (35-40 kDa) zu beobachten. Als interne Ladekontrolle wurde beta-Aktin verwendet.

#### **4.2.1 ANXA2 Lokalisation in renalen Tubulusabschnitten der Brattleboro Ratte**

Vor den Untersuchungen zur Translokation von AQP2 wurde geprüft, ob die fehlende AVP-Sekretion der Brattleboro Ratten eine Auswirkung auf die Lokalisation von ANXA2 in der Niere hat. Mittels Doppelmarkierungen auf Paraffinschnitten aus der Niere von unbehandelten Brattleboro Ratten mit Endothel- oder spezifischen Tubulusmarkern (Abb. 28 grün) und Antikörpern gegen ANXA2 (Abb. 28 rot), wurden ANXA2-positive Zellen detektiert. Sowohl die afferente und efferente Arteriole, die Kapillaren im Glomerulum, die Arteriae arcuatae, Vasa recta und Arteriae interlobares als auch Mesangialzellen, dicke aufsteigende Henle Schleife und Sammelrohr waren positiv für ANXA2. Das sind die gleichen Gefäß- und Tubulusabschnitte wie in Long-Evans Kontrollratten, Mäusen und Menschen (Abb. 21,23,24). Die Ergebnisse sind auszugsweise in Abbildung 28 gezeigt.

Die fehlende AVP-Sekretion der Brattleboro Ratten verändert die allgemeine Lokalisation von ANXA2 in der Niere nicht. Die Lokalisation ist in Brattleboro und Long-Evans Kontrollratten sowie Mensch und Maus identisch.





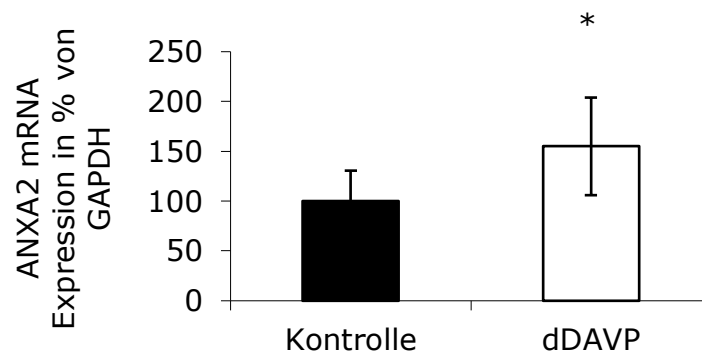
**Abb. 28. Lokalisation von ANXA2 in der Niere von Brattleboro Ratten**

Doppelfärbungen mit ANXA2 und Caveolin-1, NKCC2 oder AQP2 zeigen ausgesuchte Beispiele der Lokalisation von ANXA2 auf Paraffinschnitten in der Niere von Brattleboro Ratten. Im Cortex sind sowohl Caveolin-1 positive Kapillaren als auch Caveolin-1 negative Mesangialzellen positiv für ANXA2 (a-c). b) Auch die Caveolin-1 positiven Arteriae arcuatae sind ANXA2-positiv (d-f). In der äußeren Medula (OM) sind einige NKCC2-positiven Abschnitte der dicken aufsteigenden Henle Schleife ANXA2-positiv (g-k) und in der inneren Medula sind die AQP2-positiven Hauptzellen des Sammelrohrs ANXA2-positiv (l-n).

#### 4.2.2 ANXA2 Expression in der inneren Medulla von dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten

Wenn ANXA2 am Transport von AQP2 beteiligt ist, könnte es ähnlich wie AQP2 reguliert werden. Brattleboro Ratten exprimieren nur ein Drittel der in Long-Evans Kontrollratten üblichen AQP2-Menge. Diese Expression lässt sich durch die Gabe des fehlenden AVP, in Form von dDAVP, auf Normalwerte anheben (Abb.27) [158, 159]. Ob dDAVP auch die Expression von ANXA2 stimuliert, wurde anhand von Brattleboro Ratten, die mit dDAVP behandelt wurden, untersucht. Die Ermittlung der mRNA Expression von ANXA2 erfolgte mittels *Realtime* PCR und *TaqMan*-Sonden. Als endogene Kontrolle wurde das Referenzgen GAPDH verwendet. Abbildung 29 fasst die Ergebnisse von drei Experimenten aus innermedullärem Nierengewebe zusammen. Unbehandelte Tiere zeigten Werte von 100 +/- 31. Nach Behandlung mit dDAVP stieg die Expression von ANXA2 auf 155 +/- 49.

Das AVP-Analogon dDAVP stimuliert also sowohl die Expression von AQP2 als auch die Expression von ANXA2.



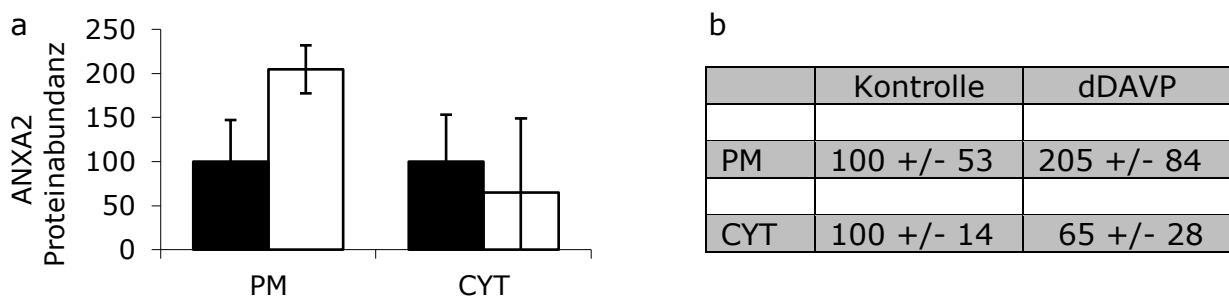
**Abb. 29. ANXA2 Expression in der inneren Medulla von dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten**

Die *TaqMan*-Analyse aus der inneren Medulla von Kontroll- bzw. dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten zeigt eine signifikant erhöhte ANXA2 Expression in behandelten Tieren (Kontrollen: 100 +/- 31; dDAVP: 155 +/- 49). Die Signifikanz wurde durch den T-Test, mit einem P-Wert von 0,013, ermittelt. Insgesamt wurden drei Sets mit jeweils 5 unbehandelten und 5 behandelten Tieren untersucht.

### 4.3 TRANSLOKATION VON ANXA2 IM SAMMELROHR VON dDAVP-BEHANDELTEN BRATTLEBORO RATTEN

Nicht nur die Expression, sondern auch der Transport von AQP2 in die apikale Plasmamembran wird durch dDAVP stimuliert. Wenn ANXA2 an diesem Transport beteiligt ist, sollte es selbst eine Translokation vollziehen. Bereits Tamma et al. haben die Anreicherung von ANXA2 in der apikalen Plasmamembran, nach cAMP-Stimulation in der Zellkultur, beschrieben [12]. Tierexperimentelle Daten sind bisher aber nicht bekannt. Daher wurde die zelluläre Lokalisation von ANXA2 im Sammelrohr von dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten mittels *Westernblot*, Immunhistologie und Elektronenmikroskopie untersucht.

Für *Westernblot*-Analysen wurde der Bereich der inneren Medulla aus den Nieren von unbehandelten und dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten homogenisiert. Mittels Zentrifugation entstanden Gewebelysate mit angereicherter Plasmamembran oder angereichertem Zytosol. Die Detektion von ANXA2 erfolgte mit einem Antikörper, der denaturiertes ANXA2 erkennt [151, 152, 160-165]. In Abbildung 30a ist die Auswertung der Westernblots von unbehandelten Tieren mit schwarzen, von dDAVP-behandelten Tieren mit weißen Balken dargestellt. Nach Behandlung verdoppelt sich die Abundanz von ANXA2 in der Plasmamembranfraktion (PM) und verringert sich ungefähr um die Hälfte in der Zytosolfraktion (Cyt) (Abb. 30b). Das lässt die Translokation von ANXA2 aus dem Zytosol in die Plasmamembran vermuten. Das Experiment wurde zwar dreimal wiederholt, jedoch standen für jede Gruppe nur drei Tiere zur Verfügung. Eine statistische Auswertung war somit nicht möglich und die Daten sind als Tendenzen zu betrachten.



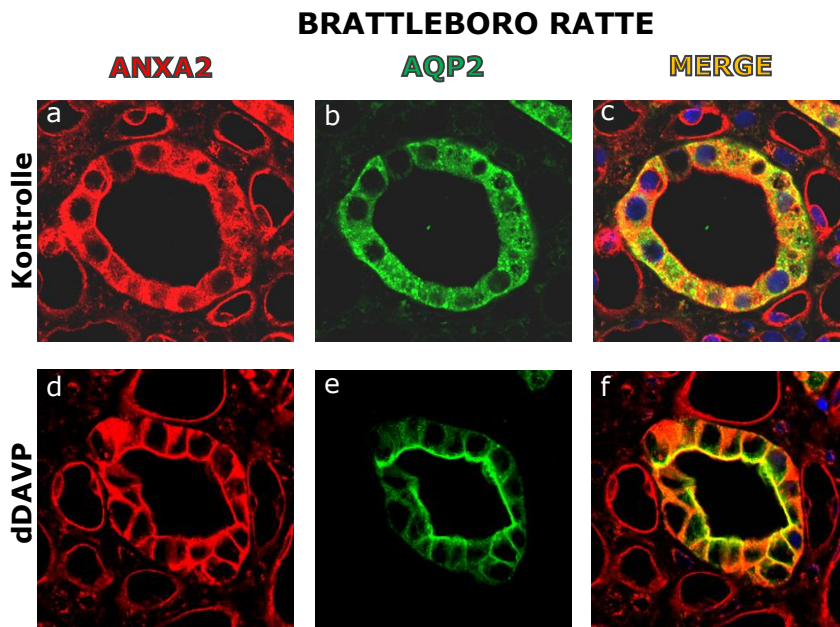
**Abb. 30. Proteinexpression und Lokalisation von ANXA2 in der inneren Medulla von dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten**

a) Proteinlysate aus der inneren Medulla von Kontroll- (schwarzer Balken) bzw. dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten wurden in der *Westernblot*-Analyse auf ANXA2 Abundanz untersucht. Homogenate mit angereicherter Plasmamembran (PM) zeigten eine gesteigerte ANXA2 Abundanz nach dDAVP Stimulation. Homogenate mit angereichertem Zytosol (CYT) zeigten nach dDAVP Stimulation eine verringerte ANXA2 Abundanz. Die

## Ergebnisse

Tabelle in b) zeigt die gemittelten Werte aus drei *Westernblots*. Für jede Gruppe standen nur jeweils drei Proben zur Verfügung. Eine statistische Auswertung war deshalb nicht möglich, sodass die Werte als Tendenzen zu betrachten sind.

Zur Verifikation der im *Westernblot* generierten Tendenzen wurden immunhistologische Analysen durch Doppelmarkierungen auf Paraffinschnitten von Nieren aus behandelten und unbehandelten Brattleboro Ratten durchgeführt. Der AQP2-Antikörper markiert die Hauptzellen des Sammelrohrs (Abb. 31 grün), der ANXA2-Antikörper lokalisiert ANXA2 (Abb. 31 rot). In Kontrolltieren sind beide Proteine über den gesamten Bereich der Zellen verteilt (Abb. 31a,b). Nach Behandlung mit dDAVP ist AQP2 stark in der apikalen Plasmamembran angereichert (Abb. 31e) [166]. Parallel dazu wandert auch ANXA2 aus dem Zytosol an die Plasmamembran (Abb. 31d). Die gleichen Ergebnisse wurden mit einem zweiten ANXA2-Antikörper (sc-1924) generiert (hier nicht gezeigt).

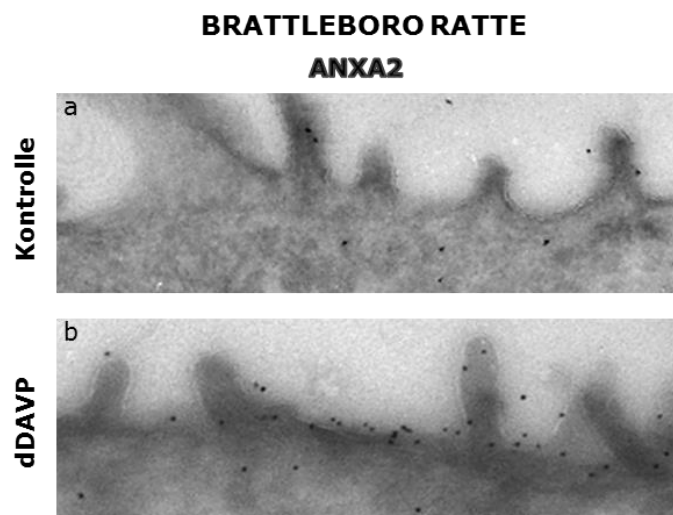


**Abb. 31. ANXA2 Translokation im Sammelrohr von dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten - Immunhistologie**

Exemplarische Darstellung der Doppelmarkierungen mit ANXA2 (rot) und AQP2 (grün) auf Paraffinschnitten von, Kontroll- und dDAVP-behandelten, Brattlebororatten. Nach Stimulation mit dDAVP ist eine Ko-Translokation beider Proteine aus dem Zytosol zur apikalen Plasmamembran zu beobachten. Insgesamt wurden 15 Kontroll- und 15 dDAVP-behandelte Tiere untersucht.

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden Ultra-Kryo Schnitte, aus innermedullärem Nierengewebe von behandelten und unbehandelten Brattleboro Ratten analysiert. Der hier verwendete ANXA2-Antikörper wurde bereits vorher auf Ultra-Kryo Schnitten verwendet [162]. Die einzelnen ANXA2-Proteine sind aufgrund der mit Goldkügelchen gekoppelten Sekundärantikörper als schwarze Punkte sichtbar. Abbildung 32 zeigt exemplarisch jeweils den Ausschnitt einer Sammelrohrzelle mit apikaler Plasmamembran. In unbehandelten Tieren ist ANXA2 gleichmäßig über die Zelle verteilt (Abb. 32a). Nach Behandlung mit dDAVP ist es hauptsächlich an der apikalen Plasmamembran akkumuliert (Abb. 23b). Die gleichen Ergebnisse wurden mit einem zweiten ANXA2-Antikörper (sc-1924) generiert (hier nicht gezeigt).

Alle drei experimentellen Ansätzen zeigen die Translokation von ANXA2 nach Aktivierung der V2-Rezeptor-Signalkaskade im Tiermodell. ANXA2 wandert zusammen mit AQP2 aus dem Zytosol an die apikale Plasmamembran.



**Abb. 32. ANXA2 Translokation im Sammelrohr von dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten – Elektronenmikroskopie**

Exemplarische Darstellung der apikalen Plasmamembran einer Sammelrohrzelle aus Ultra-Kryo Schnitten von Kontroll- und dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten. Immungoldmarkierungen von ANXA2 sind als schwarze Punkte sichtbar. In Kontrolltieren verteilt sich ANXA2 über die gesamte Zelle (a). Bei Brattleboro Ratten, mit dDAVP behandelt wurden reichert sich ANXA2 an der Plasmamembran an (b).

#### 4.4 PROTEIN-PROTEIN INTERAKTION

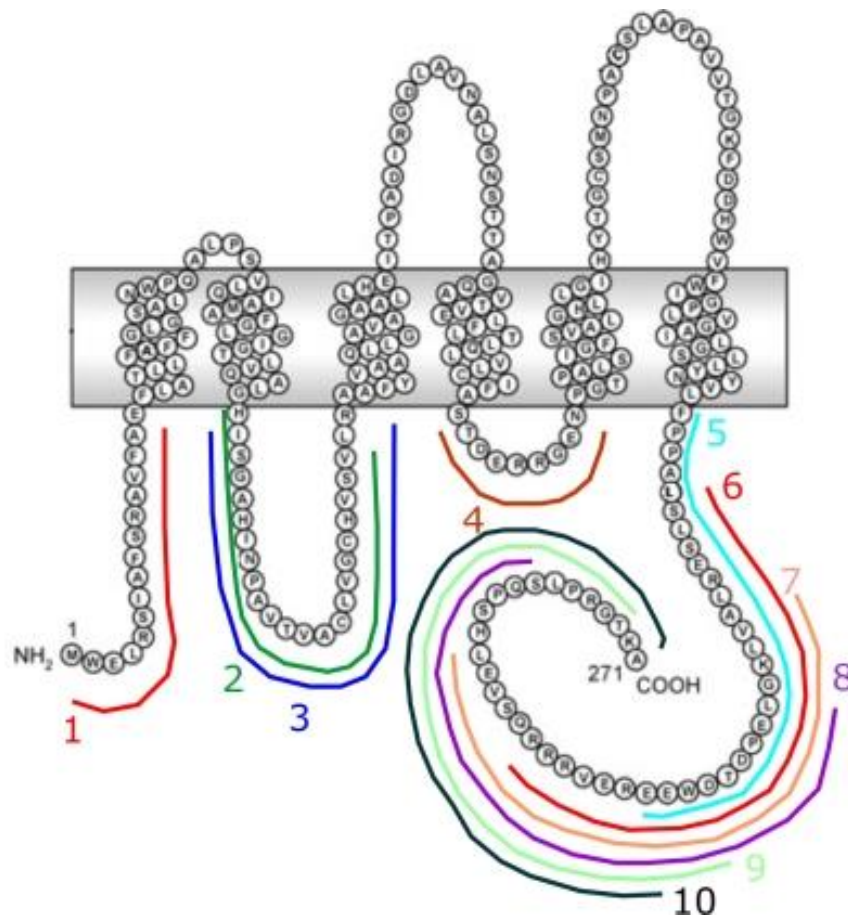
Während der Aktivierung des Urinkonzentrationsmechanismus ko-translozieren ANXA2 und AQP2 in die apikale Plasmamembran (Abb.31). Wird ANXA2 inhibiert, ist die Fusion von AQP2-tragenden Vesikeln mit der Plasmamembran gestört [12]. Doch wie genau interagiert ANXA2 mit AQP2? Bisher haben sich nur zwei Veröffentlichungen mit diesem Thema beschäftigt [11, 12]. Direkte Interaktionsdaten wurden aber nicht generiert. Hier soll untersucht werden inwiefern ANXA2 mit AQP2 eine Bindung eingeht. Dabei werden folgende Fragen geklärt:

Findet generell eine Interaktion zwischen ANXA2 und AQP2 statt und beruht diese Interaktion auf einer direkten Protein-Proteinbindung? In vielen Endozytose-, Exozytose- und Recyclingprozessen spielt der Phosphorylierungsgrad von ANXA2 eine Rolle [56, 111-117, 121, 122]. Die Phosphostellen werden antagonistisch durch Kalzium- und cAMP-abhängige Signalkaskaden reguliert [102-108, 110, 167]. Wird die V2-Rezeptor-Signalkaskade aktiviert, werden beide Signalwege angestoßen. Beide Signalwege sind notwendig für die apikale Translokation von AQP2 [47, 48, 168, 169]. Spielt also der Phosphorylierungsgrad von ANXA2 für die Interaktion mit AQP2 eine Rolle?

Sollte ANXA2 mit AQP2 interagieren aber keine direkte Bindung ausüben, könnten Adapterproteine beteiligt sein. Für den Transport von anderen Kanälen, wie z.B. des Natriumkanals, Nav 1.8, oder der Kalziumkanäle TRPV5 und TRPV6 ist das Tetramer, bestehend aus zwei ANXA2 und zwei P11 Molekülen, essentiell [6, 7, 81]. Im Yeast Two-Hybrid System wurde gezeigt, dass die Bindung des ANXA2-P11-Tetramers an die oben genannten Kanäle über P11 erfolgt. Ist also auch P11 an der Translokation von AQP2 beteiligt? Und bindet P11 direkt an AQP2, oder führt evtl. die Kombination aus P11 und ANXA2 zu einer direkten AQP2-Bindung?

Für den Nachweis einer generellen Interaktion wurden Ko-Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Eine direkte Bindung wurde mittels *Peptid SPOT Arrays* detektiert. Hierzu wurden 10 Peptide, die den gesamten zytosolischen Bereich von AQP2 darstellen, auf eine Zellulosemembran synthetisiert. Große Domänen, wie z.B. der N-Terminus, wurden aufgeteilt, in höchstens 25 Aminosäuren lange und sich um fünf Aminosäuren überlappende

Peptide. In Abbildung 33 ist die Primärsequenz aller Peptide dargestellt. Die Zahlen markieren das jeweils farblich passende Peptid.



**Abb. 33. Aufteilung der zytosolischen Domänen von AQP2 in 10 Peptide**

Die in verschiedenen Farben markierten Zahlen und die farblich passenden Linien markieren den Bereich der 10 generierten Peptide aus dem gesamten zytosolischen Bereich von AQP2. Die Aminosäuresequenz von AQP2 wurde aus [170] übernommen.

Die Inkubation der mit AQP2-Peptiden gespotteten Membranen erfolgte mit den synthetisch hergestellten Proteinen ANXA2, ANXA2\_Y24D (imitiert Phosphorylierung am Y24 [56]), ANXA2\_S26D (imitiert Phosphorylierung am S26 [56]), P11 und der Kombination aus P11 und den ANXA2-Varianten. Die Bindung der Proteine an eines der 10 Peptide wurde mittels Antikörpernachweis detektiert. Dass die verwendeten Antikörper die synthetisch hergestellten Proteine erkennen wurde im Vortest gezeigt (Abb.34). Hierzu wurden drei Nitrozellulosemembranen mit jeweils einem Mikroliter einer mikromolaren Lösung der synthetisch hergestellten Proteine P11, BSA, ANXA, ANXA2\_Y24D und ANXA2\_S26D (von oben nach unten) betropft. Der Nachweis der Proteine erfolgte auf der ersten Membran mit einem ANXA2-Kaninchen-Antikörper, auf der zweiten Membran mit einem P11-Kaninchen-Antikörper. Anschließend

## Ergebnisse

wurden alle drei Membranen mit einem an HRP-gekoppelten Sekundär-Antikörper aus dem Kaninchen inkubiert. Der P11-Antikörper erkennt P11, der ANXA2-Antikörper erkennt alle ANXA2-Varianten. Eine Kreuzreaktivität war nicht festzustellen und der Sekundärantikörper zeigte keine unspezifischen Bindungen.

	ANXA2-rb	P11-rb	rb-HRP
P11		●	
BSA			
ANXA2	●		
ANXA2_Y24D	●		
ANXA2_S26D	●		

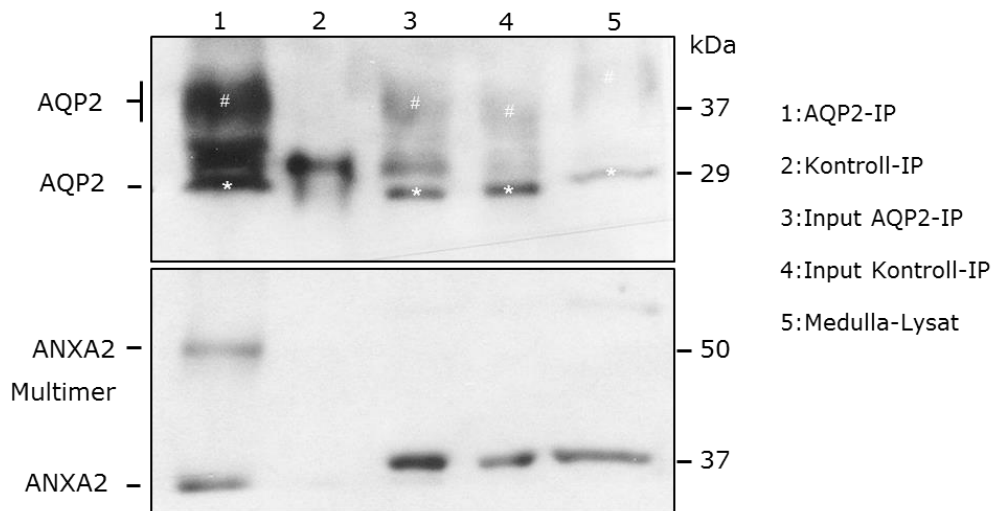
### Abb. 34. Antikörpertest auf synthetisch hergestellten Proteinen

Je 1 µl einer 1 µM Lösung der synthetisch hergestellten Proteine P11, ANXA2, ANXA2\_Y24D, ANXA2\_S26D und zum Vergleich BSA, wurde auf drei Nitrozellulosemembranen getropft. Membran 1 wurde mit einem ANXA2-Kaninchen-Antikörper und Membran 2 mit einem P11-Kaninchen-Antikörper inkubiert. Der Sekundärantikörper (Kaninchen-HRP) wurde auf alle drei Membranen gegeben. Der P11-Antikörper erkennt das P11-Protein. Der ANXA2-Antikörper erkennt alle drei ANXA2-Varianten. Eine Kreuzreaktivität wurde nicht festgestellt und der Sekundärantikörper zeigt keine unspezifische Bindung. Der Antikörpertest wurde in drei unabhängigen Experimenten bestätigt.

#### 4.4.1 Interaktion zwischen ANXA2 und AQP2

Die Protein-Protein Interaktion von ANXA2 und AQP2 wurde mittels Ko-Immunpräzipitation untersucht. Durch Verwendung eines AQP2-Antikörpers konnte sowohl die glykolysierte Form bei 35-40 kDa (#) als auch die nicht glykolysierte Form von AQP2 bei 29 kDa (\*) immunpräzipitiert werden (Abb. 35 Spur 1 oben). Auf demselben Blot war ANXA2 nachweisbar (Abb. 35 Spur 1 unten). Zusätzlich wurde eine ANXA2-positive Bande bei zirka 55 kDa detektiert. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um ein ANXA2-Multimer. In der Kontroll-Immunpräzipitation, bei der unspezifische IgG-Antikörper verwendet wurden, waren weder AQP2 noch ANXA2 nachweisbar (Abb. 35 Spur 2 oben und unten). Spuren 3 und 4 zeigen beide Proteine in den jeweiligen Überständen der AQP2- und Kontroll-Immunpräzipitation. Anhand des in Spur 5 aufgetragenen, Nierenlysates aus der Medulla, ist die Höhe bei der die beiden Proteine im *Westernblot* laufen, abzulesen.

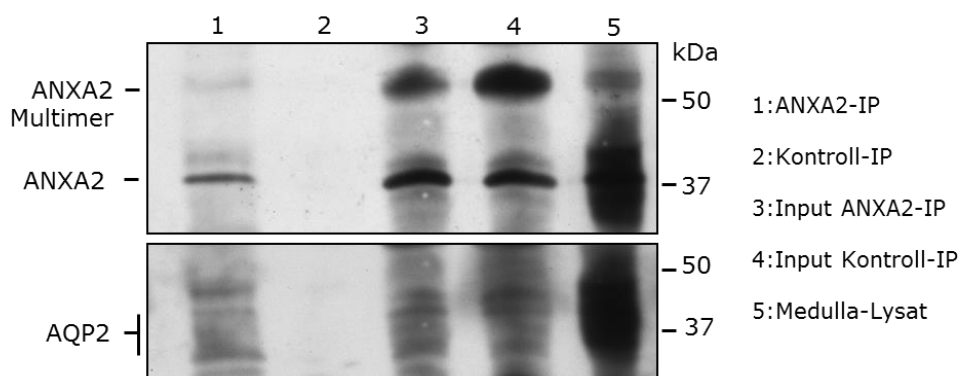




### Abb. 35. Ko-Immünpräzipitation von AQP2 und ANXA2

ANXA2 und AQP2 bilden einen Komplex, der mithilfe eines AQP2-Antikörpers präzipitiert werden kann. AQP2 wurde aus dem medullären Nierenlysat aus Sprague-Dawley Ratten präzipitiert. Im *Westernblot* konnten zwei spezifische Banden mithilfe des AQP2-Antikörpers nachgewiesen werden. Die 29 kDa Bande zeigt die nicht-glykolysierte (\*), die 35-40 kDa Bande die glykolysierte (#) Form. Beide Banden fehlen in der IgG-Kontroll-Immünpräzipitation, sind aber in den Überständen (Input) und im Medulla-Lysat, vorhanden. ANXA2 wurde sowohl als Monomer (37 kDa) als auch als Multimer (55 kDa) ko-immünpräzipitiert. In der Kontroll-Immünpräzipitation waren beide Banden nicht nachweisbar. In Spur 1-3 sind Banden bei zirka 30 kDa zu erkennen. Das entspricht ungefähr der Größe der leichten Ketten von IgGs. In diesem Experiment wurde für das Fischen und für den Nachweis von AQP2 derselbe Antikörper verwendet. Daher führt der Nachweis von AQP2 im *Westernblot* zur Detektion der AQP2-Antikörper, die ihr spezifisches Protein auf der Membran gebunden haben, als auch der Antikörper, die sich in der Probe befanden, die gelelektrophoretisch aufgetrennt wurde. Das Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt.

Auch in der Immünpräzipitation von ANXA2 wurde AQP2 ko-immünpräzipitiert (Abb. 36 Spur 1 oben und unten). Beide Proteine waren in der Kontroll-Immünpräzipitation nicht detektierbar (Abb. 36 Spur 2). Spur 3 und 4 zeigen die Überstände beider Immünpräzipitationen. Die Laufhöhe von AQP2 und ANXA2 ist in Spur 5, anhand des Nierenhomogenats aus der Medulla, abzulesen.

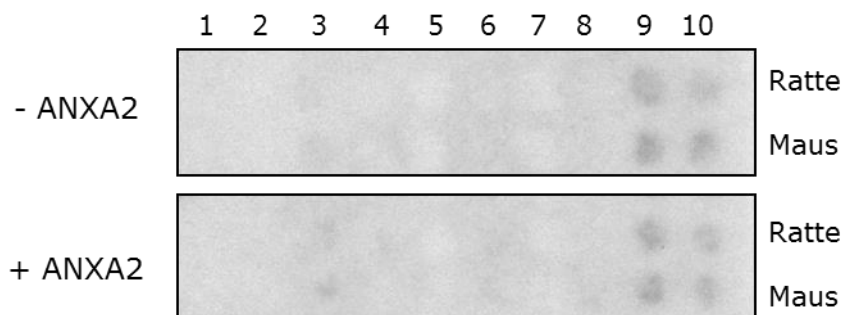


**Abb. 36. Ko-Immunpräzipitation von ANXA2 und AQP2**

ANXA2 und AQP2 bilden einen Komplex, der mithilfe eines ANXA2-Antikörpers präzipitiert werden kann. ANXA2 wurde aus dem medullären Nierenlysat aus Sprague-Dawley Ratten präzipitiert. Im *Westernblot* wurden zwei spezifische Banden mithilfe des ANXA2-Antikörpers nachgewiesen. Die 37 kDa Bande zeigt das ANXA2-Monomer, die 55 kDa Bande ein ANXA2-Multimer. Beide Banden fehlen in der IgG-Kontroll-Immunpräzipitation, sind aber in den Überständen (Input) und im Medulla-Lysat vorhanden. AQP2 wurde durch den ANXA2-Antikörper ko-immunpräzipitiert, konnte in der Kontroll-Immunpräzipitation aber nicht nachgewiesen werden. Das Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt.

ANXA2 und AQP2 lassen sich ko-immunpräzipitieren (Abb.35,36). Ob sie direkt aneinander binden ist damit nicht geklärt. Um dieser Frage nachzugehen wurden *Peptid SPOT Arrays* durchgeführt (Abb. 37). Als Bibliothek dienten Peptide aus dem Intrazellulärbereich von Ratten- und Maus-AQP2, gekoppelt an eine Nitrozellulosemembran. Diese wurden mit synthetisch hergestelltem ANXA2 Protein inkubiert. Selbst nach langen Entwicklungszeiten von 30 Minuten war keine Bindung von ANXA2 an eines der 10 Peptide detektierbar.

ANXA2 und AQP2 kommen demzufolge in einem gemeinsamen Komplex vor. Eine direkte Bindung zwischen den beiden Proteinen besteht aber nicht.

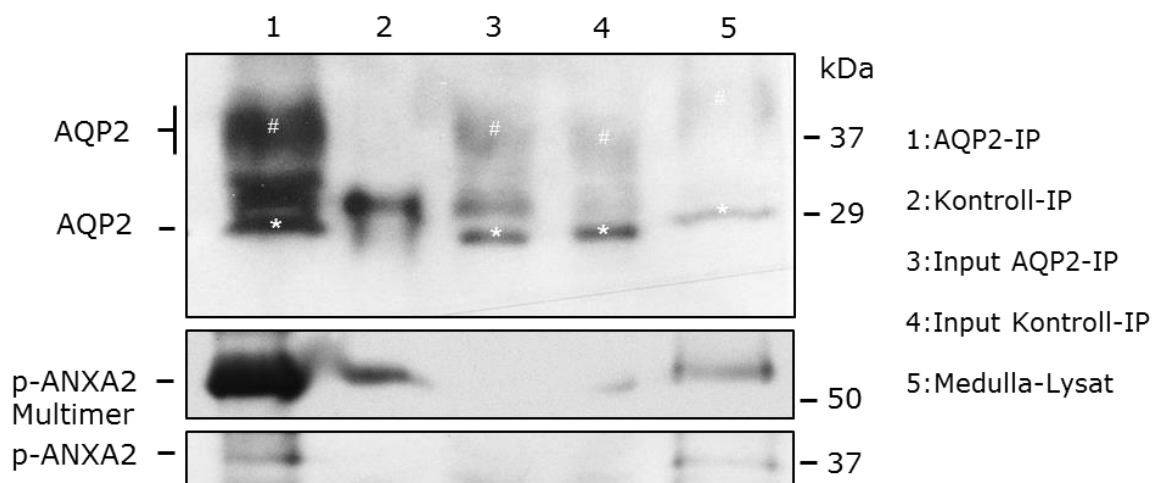


**Abb. 37. Peptid SPOT Array mit AQP2 Bibliothek und ANXA2 Protein**

Zehn Peptide aus dem Intrazellulärbereich von Ratten- oder Maus-AQP2, gekoppelt an eine Nitrozellulosemembran, wurden mit einer 0,2 µM Lösung von rekombinant hergestelltem ANXA2 Protein inkubiert. Nach 30-minütiger Entwicklung konnte keine Bindung detektiert werden. Das Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt.

#### 4.4.2 Interaktion zwischen phospho-ANXA2 und AQP2

Die Exozytose- und Bindeeigenschaften von ANXA2 werden unter anderem über Phosphorylierungen reguliert. Die V2-Rezeptor-Signalkaskade erhöht die cAMP Spiegel und mobilisiert Kalzium. Der cAMP-Signalweg führt zur Phosphorylierung von ANXA2 am Y24. Die Kalziummobilisierung verursacht die Phosphorylierung von S12 und S26. Ob der Phosphostatus von ANXA2 auch eine Rolle bei der Interaktion mit AQP2 spielt, wurde mittels Immunpräzipitation und *Peptid SPOT Array* analysiert. Abbildung 38 zeigt die Immunpräzipitation von AQP2 (Spur 1 oben). Auf demselben Blot ließ sich auch das Multimer (55 kDa) und das Monomer (37 kDa) von phospho-ANXA2\_Y24 (Spur 1 unten) nachweisen. In der Kontroll-Immunpräzipitation, bei der unspezifische IgG-Antikörper verwendet wurden, waren weder AQP2 noch phospho-ANXA2 nachweisbar (Abb. 38 Spur 2 oben und unten). Phospho-ANXA2 kommt also in demselben Komplex wie AQP2 vor.



#### Abb. 38. Ko-Immunpräzipitation von AQP2 und phospho-ANXA2

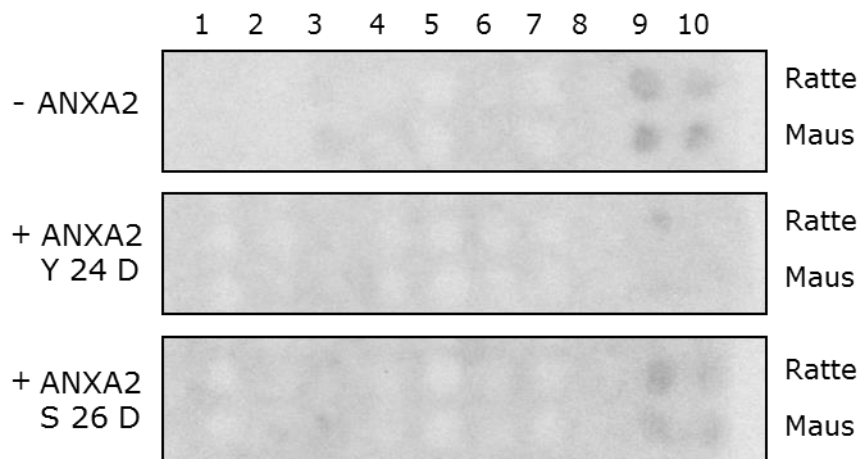
Phospho-ANXA2\_Y24 und AQP2 bilden einen Komplex, der mithilfe des AQP2-Antikörpers präzipitiert werden kann. AQP2 wurde aus dem medullären Nierenlysat aus Sprague-Dawley Ratten präzipitiert. Im *Westernblot* wurden zwei spezifische Banden mithilfe des AQP2-Antikörpers nachgewiesen. Die 29 kDa Bande zeigt die nicht-glykolysierte (\*), die 35-40 kDa Bande die glykolysierte (#) Form. Beide Banden fehlen in der IgG-Kontroll-Immunpräzipitation, sind aber in den Überständen (Input) und im Medulla-Lysat vorhanden.

Durch den AQP2-Antikörper wurde Phospho-ANXA2\_Y24 sowohl als Monomer (37 kDa) als auch als Multimer (55 kDa) ko-immunpräzipitiert. In der Kontroll-Immunpräzipitation war es nicht nachweisbar. Das Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt.

## Ergebnisse

Die Analyse einer direkten Bindung erfolgte mittels *Peptid SPOT Arrays*. Hierzu wurden die AQP2 Bibliotheken mit ANXA2\_Y24D, welches eine Phosphorylierung am Tyrosin 24 imitiert, und ANXA2\_S26D, welches eine Phosphorylierung am Serin 26 imitiert, inkubiert (Abb. 39). Nach 30-minütiger Entwicklung konnte keine Bindung nachgewiesen werden.

Phospho-ANXA2\_Y24 und AQP2 kommen demzufolge in einem gemeinsamen Komplex vor. Eine direkte Bindung zwischen den beiden Proteinen existiert jedoch nicht.



**Abb. 39. Peptid SPOT Array mit AQP2 Bibliothek und ANXA2\_Y24D sowie ANXA2\_S26D Protein**

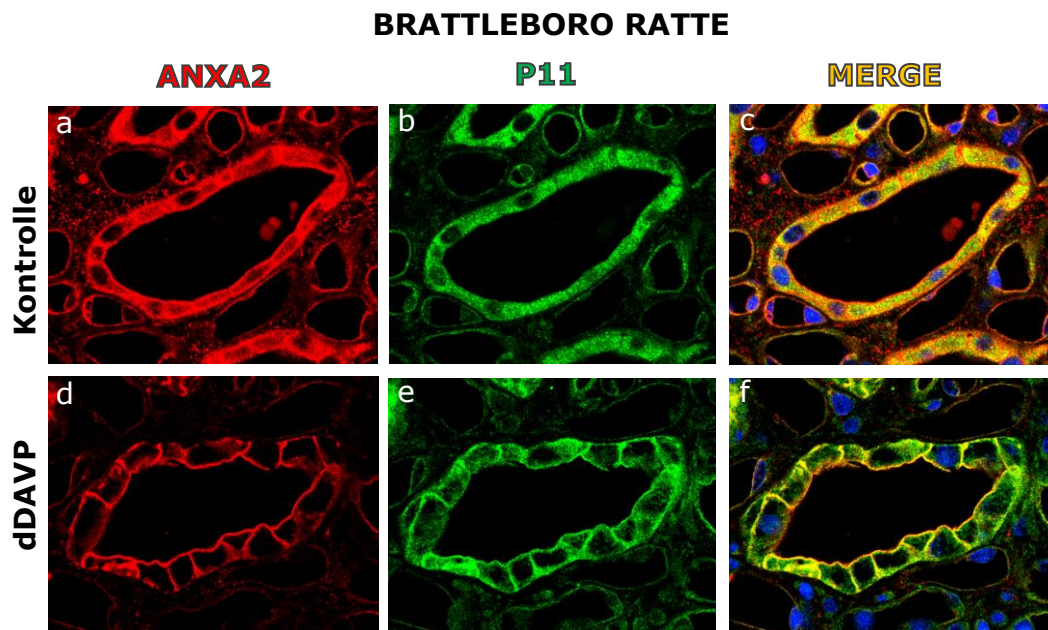
Zehn Peptide aus dem Intrazellulärbereich von Ratten- oder Maus-AQP2, gekoppelt an eine Nitrozellulosemembran, wurden mit rekombinant hergestelltem ANXA2\_Y24D oder ANXA2\_S26D Protein inkubiert. Nach 30-minütiger Entwicklung konnte keine Bindung detektiert werden. Das Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt.

### 4.4.3 P11 Translokation im Sammelrohr von dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten

Obwohl ANXA2 und phospho-ANXA2\_Y24 zusammen mit AQP2 in einem gemeinsamen Komplex gezeigt wurden, konnte keine direkte Bindung zwischen diesen Molekülen nachgewiesen werden. Es stellte sich daher die Frage, ob ein Adapterprotein die Bindung vermittelt. Vor allem aus Gefäßstudien ist bekannt, dass sich ANXA2 und P11 zu einem Tetramer vereinen [96, 117, 171, 172]. Beide Proteine sind an der Translokation der Kanäle Nav 1.8, TRPV5, TRPV6, ASIC1a, und 5-HT1b beteiligt [6-10]. Zusätzlich beschreiben Tamma et al. [12] die Interaktionsmöglichkeit von ANXA2 mit P11 als essentiell für die Fusion von AQP2-tragenden Vesikeln mit der Plasmamembran, sodass hier untersucht wurde ob P11, ANXA2 und AQP2 auch *in vivo* kolokalisieren. Dazu wurden

immunhistologische Analysen mittels Doppelmarkierungen auf Paraffinschnitten von Nieren aus Brattleboro Ratten durchgeführt. Sowohl ANXA2 als auch P11 wurden im Sammelrohr detektiert (Abb. 40). In unbehandelten Tieren waren beide Proteine über den gesamten zytosolischen Bereich der Hauptzellen verteilt (Abb. 40a-c). Nach Behandlung mit dDAVP fand eine Translokation von P11 aus dem zytosolischen Bereich in die Plasmamembran statt (Abb. 40b,e). Parallel dazu translozierte auch ANXA2 (Abb. 40a,d).

Die Ergebnisse zeigen die Ko-Translokation von P11 und ANXA2. Auch AQP2 wird nach dDAVP-Stimulation aus dem Zytosol in die apikale Plasmamembran umverteilt (Abb. 31) Alle drei Proteine sind demnach sowohl vor, als auch nach der Stimulation kolokalisiert. P11 könnte also am Transport von AQP2 beteiligt sein.



**Abb. 40. Ko-Translokation von P11 und ANXA2 im Sammelrohr von dDAVP-behandelten Brattlebororatten**

Exemplarische Darstellung der Doppelmarkierungen von ANXA2 (rot) und P11 (grün) auf Paraffinschnitten von, Kontroll- und dDAVP-behandelten, Brattlebororatten. Nach Stimulation mit dDAVP ist eine Ko-Translokation beider Proteine aus dem Zytosol zur apikalen Plasmamembran zu beobachten. Insgesamt wurden 15 Kontroll- und 15 dDAVP-behandelte Tiere untersucht.

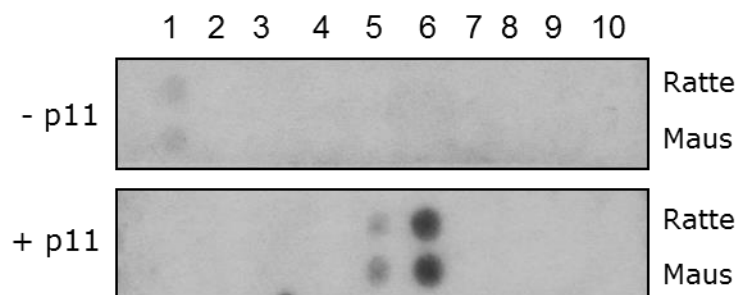
#### 4.4.4 Interaktion zwischen P11, ANXA2 und AQP2

P11, ANXA2 und AQP2 ko-translozieren nach einer Stimulation mit dem AVP-Analogon dDAVP aus dem Zytosol an die apikale Plasmamembran der Hauptzellen des Sammelrohrs. Ob und wie die drei Proteine miteinander interagieren, soll hier untersucht werden. Die vorliegende Arbeit hat gezeigt,

## Ergebnisse

dass ANXA2 keine direkte Bindung mit AQP2 eingeht. Es ist jedoch bekannt, dass ANXA2 und P11 einen Komplex, bestehend aus zwei ANXA2 und zwei P11 Molekülen, ausbilden [58, 73-77]. Denkbar wäre also, dass P11 als Adapterprotein fungiert. Um dieser Rolle gerecht zu werden, müsste es entweder direkt an AQP2 binden und somit eine Brückenfunktion übernehmen, oder Konformationsänderungen während der ANXA2-P11-Tetramerbildung könnten zu einer direkten Bindung an AQP2 führen. Beide Möglichkeiten wurden im Folgenden mittels *Peptid SPOT Array* untersucht.

Für die Analyse einer Bindung zwischen P11 und AQP2 wurde die AQP2-Bibliothek mit synthetisch hergestelltem P11 inkubiert. Nach dreiminütiger Entwicklung konnte eine direkte Bindung zwischen P11 und dem AQP2-Peptid 6 aus Ratte und Maus nachgewiesen werden (Abb. 41). Diese Bindung war in der Negativkontrolle nicht detektierbar



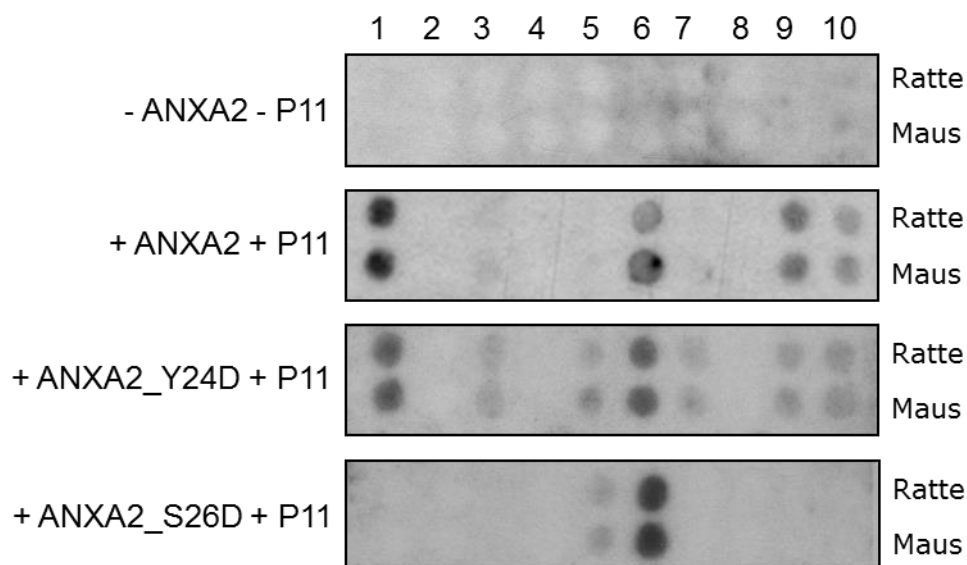
### **Abb. 41. Peptid SPOT Array mit AQP2 Bibliothek und P11 Protein**

Zehn Peptide aus dem Intrazellulärbereich von Ratten- oder Maus-AQP2, gekoppelt an eine Nitrozellulosemembran, wurden mit einer 0,2  $\mu\text{M}$  Lösung von rekombinant hergestelltem P11 Protein inkubiert. Nach dreiminütiger Entwicklung wurde eine direkte Bindung von P11 an Peptid 6 detektiert. In der Negativkontrolle, die mit Blockmedium ohne P11 inkubiert wurde, war keine Bindung nachweisbar. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt.

Für die Analyse einer Bindung zwischen dem ANXA2-P11-Tetramer und AQP2 wurde die AQP2-Bibliothek mit einer Kombination aus synthetisch hergestelltem P11 und ANXA2 inkubiert. Da die Literatur keinen Aufschluss darüber gibt, ob eine bestimmte Phosphorylierung von ANXA2 für die Ausbildung des Tetramers nötig ist, wurde auch die Kombination ANXA2\_Y24D-P11 und ANXA2\_S26D-P11 auf ihre Bindefähigkeit für AQP2 getestet (Abb. 42). Nach dreiminütiger Entwicklungszeit zeigte die Kombinationen aus ANXA2 und P11, bzw. aus ANXA2\_Y24D und P11 eine direkte Bindung an Peptid 6 und Peptid 1. Die Kombination aus ANXA2\_S26D und P11 zeigte nur die Bindung an Peptid 6. In der Negativkontrolle waren keine Bindungen nachweisbar. Peptid 1 umfasst die

ersten 25 Aminosäuren aus dem N-Terminus von AQP2. Peptid 6 beinhaltet die Aminosäuren 230-254 aus dem C-Terminus von AQP2 (Tab. 5).

Die Protein-Protein Interaktionsstudie zeigt also eine direkte Bindung zwischen P11 und dem C-Terminus von AQP2. AQP2 benötigt für diese Bindung den Bereich zwischen den Aminosäuren 230 und 254. Die Kombination aus P11 und ANXA2 bzw. P11 und ANXA2\_Y24D bindet zusätzlich an den N-Terminus von AQP2 im Bereich der ersten 25 Aminosäuren. Ob P11, ANXA2 oder beide zusammen diese Bindung ausüben, bleibt ungeklärt. Da die Kombination aus ANXA2 und P11 bzw. ANXA2\_Y24D und P11 eine zusätzliche Bindung mit Peptid 1 eingeht, welche beide Proteine einzeln nicht zeigen, ist davon auszugehen, dass ein ANXA2-P11-Tetramer und ein ANXA2\_Y24-P11-Tetramer ausgebildet wurde. Das heißt die Phosphorylierung am Y24 hat keinen Einfluss auf die Tetramerausbildung und spielt für die Bindung an AQP2 keine Rolle. Im Gegensatz dazu bindet die Kombination aus P11 und ANXA2\_S26D nicht zusätzlich an Peptid 1. Diese Phosphorylierung hemmt also entweder die Ausbildung des Tetramers oder die Bindung an AQP2.

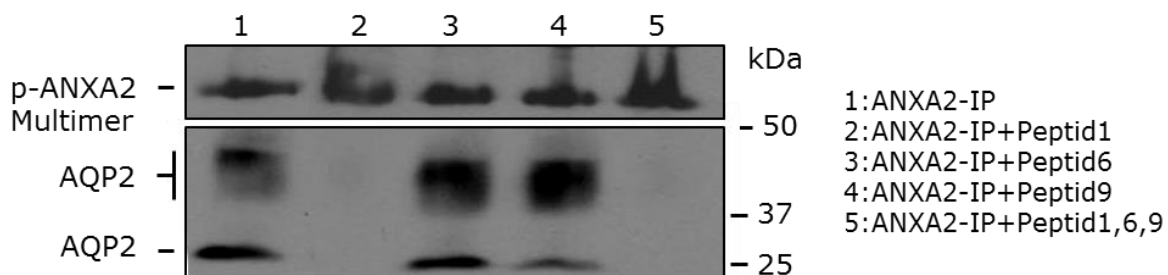


**Abb. 42. Peptid SPOT Array mit AQP2 Bibliothek und ANXA2-P11-Tetramer**

Die AQP2-Bibliotheken wurden mit einer 0,2 µM Lösung aus jeweils P11 und den verschiedenen ANXA2 Varianten inkubiert. Nach dreiminütiger Entwicklung zeigten sowohl die Kombination aus ANXA2 und P11 als auch ANXA2\_Y24D und P11 eine direkte Bindung mit Peptid 1 und 6. Die Kombination aus ANXA2\_S26D und P11 zeigte eine direkte Bindung mit Peptid 6 und die Negativkontrolle zeigte keine Bindung. Die Inkubation mit ANXA2\_S26D+P11 wurde zweimal, alle übrigen Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt.

#### 4.5 VERIFIKATION UND BEWERTUNG DER PROTEIN-PROTEIN INTERAKTION

Um die Bindungsstudien der direkten Protein-Protein Interaktion zu verifizieren wurden Ko-Immünpräzipitationen mit inhibitorischen Peptiden durchgeführt. Die vorliegende Arbeit hat bereits mittels *Peptid SPOT Array* eine direkte Bindung, zwischen P11 und AQP2-Peptid 6 bzw. zwischen dem ANXA2-P11-Tetramer und AQP2-Peptid 1 und 6, gezeigt. Um herauszufinden ob diese Abschnitte von AQP2 tatsächlich für die Interaktion mit ANXA2 verantwortlich sind, wurden die Peptide 1, 6 und zum Vergleich Peptid 9 (Tab. 3) in löslicher Form synthetisiert und jeweils als inhibitorische Peptide zu verschiedenen Ansätzen von ANXA2-Immünpräzipitation gegeben. Abbildung 43 (Spur 1 oben) zeigt die Immünpräzipitation von ANXA2 durch einen phospho-ANXA2-Antikörper. In demselben Ansatz wird sowohl die glykolysierte, als auch die nicht glykolysierte Form von AQP2 ko-immünpräzipitiert (Abb. 43 Spur 1 unten). Durch Zugabe der inhibitorischen Peptide ändert sich die Menge des immünpräzipitierten phospho-ANXA2 nicht (Abb. 43 Spur 1-5 oben). Die Menge an ko-immünpräzipitiertem AQP2 verringert sich aber drastisch nach Zugabe von Peptid 1 (Abb. 43 Spur 2 und 5 unten). Peptid 6 hat keinen Einfluss auf die Ko-Immünpräzipitation von AQP2 (Abb. 43 Spur 3). Betrachtet man die Ergebnisse in Zusammenhang mit den durchgeführten *Peptid SPOT Arrays*, so unterstützen sie die Bindung zwischen dem ANXA2-P11-Tetramer und dem N-Terminus (Peptid 1) von AQP2. Die Bindung zwischen P11 und C-Terminus von AQP2 (Peptid 6) wurde mit dieser Methode nicht bestätigt.



**Abb. 43. Hemmung der Ko-Immünpräzipitation von ANXA2 und AQP2 mit inhibitorischem AQP2-Peptid 1**

Das Nierenlysat aus der Medulla-Präparation einer Sprague Dawley Ratte wurde in fünf Ansätze aufgeteilt. Die Nierenlysate aus Ansätzen 2-5 wurden vor der Immünpräzipitation mit 300 nmol der Peptide 1,6 und 9 einzeln oder gemeinsam inkubiert. Der Nachweis von phospho-ANXA2 im *Westernblot* zeigt die gelungene ANXA2 Immünpräzipitation. Die Ansätze 1, 3 und 4 zeigen eine vergleichbare Menge an AQP2. Die Ansätze mit Peptid 1 zeigen im Vergleich dazu eine drastisch verringerte Menge an AQP2. Das Experiment wurde dreimal mit 300 nmol und einmal mit 30 nmol Peptiden durchgeführt. 30 nmol Peptid zeigte keinen Einfluss.



Um die unterschiedlichen Ergebnisse aus *Peptid SPOT Array* und Ko-Immunpräzipitation mit inhibitorischen Peptiden zu bewerten, müssen die Eigenschaften beider Methoden dargelegt werden. Die Ko-Immunpräzipitation arbeitet mit den natürlichen Interaktionspartnern. Sie kann aber keine direkten Bindungen zeigen. Sie liefert lediglich den Nachweis, dass Proteine in einem gemeinsamen Komplex vorkommen. *Peptid SPOT Arrays* sind genauer. Sie können die Bindung zwischen zwei Proteinen bis auf eine Aminosäure exakt bestimmen. An dieser Interaktion sind aber nicht zwei korrekt gefaltete Proteine beteiligt. Die Peptide auf der Nitrozellulosemembran sind höchstens 25 Aminosäuren lang und liefern lediglich die Primärstruktur eines Proteinabschnittes. Daher können artifizielle Bindungen entstehen. Außerdem können Bindungen, die eine korrekte räumliche Anordnung benötigen, verborgen bleiben. Mittels *Peptid SPOT Array* zeigt diese Arbeit eine direkte Bindung des ANXA2-P11-Tetramers an den N-Terminus (Peptid 1) von AQP2. Der Einsatz von Peptid 1 als inhibitorisches Peptid in der Ko-Immunpräzipitation bestätigt diese Bindung. Durch den Einsatz der beiden unterschiedlichen Methoden wurde die Bindung zwischen natürlich gefalteten Proteinen nachgewiesen und zusätzlich die hierfür verantwortliche Primärsequenz von AQP2 ermittelt.

Weiterhin zeigt diese Arbeit im *Peptid SPOT Array* eine direkte Bindung zwischen P11 und dem C-Terminus (Peptid 6) von AQP2. In der Ko-Immunpräzipitation mit inhibitorischem Peptid 6 wurde diese Bindung jedoch nicht bestätigt. Das kann eine falsch-positive Bindung oder eine fehlende Eignung von Peptid 6 zur Kompetition bedeuten. Da Peptid 6 die natürliche, dreidimensionale Struktur von AQP2 vermutlich nicht imitieren kann, beruht die im *Peptid SPOT Array* detektierte Bindung zwischen P11 und Peptid 6 auf der Primärsequenz von Peptid 6. Wenn der Bereich von Peptid 6 im natürlich gefalteten Protein nicht für P11 zugänglich ist, würde es sich hier um eine artifizielle Bindung handeln, die in der Ko-Immunpräzipitation mit inhibitorischem Peptid nicht bestätigt werden kann. Andererseits könnte die fehlende Verifikation der Bindung zwischen P11 und AQP2 auch daran liegen, dass die gegebenenfalls bestehende, natürliche Bindung so stark ist, dass Peptid 6 in der Ko-Immunpräzipitation keine kompetitive Wirkung aufbauen kann. Demzufolge würde sich die Bindung durch das Peptid 6 nicht lösen und wäre somit mit der gewählten Methode nicht nachweisbar. In diesem Fall könnte die im *Peptid SPOT Array* detektierte Bindung zwischen P11 und dem C-Terminus von AQP2 (Peptid 6) der Wirklichkeit entsprechen.

## 5. DISKUSSION

Die Niere gewährleistet die Homöostase im Wasser-Salz-Haushalt. Die Menge und Osmolalität des ausgeschiedenen Urins wird durch AVP reguliert. Störungen des AVP-Systems können sowohl Hypo- als auch Hybernatriämie verursachen. Ein bewährtes Tiermodell zur Untersuchung der V2-Rezeptor-Signalkaskade sind die Brattleboro Ratten. Aufgrund einer Mutation sind sie nicht in der Lage, AVP zu sezernieren. In ihrem Sammelrohr wird der Wasserkanal, AQP2, vermindert exprimiert und die Translokation von vorhandenen, AQP2-tragenden Vesikeln aus zytosolischen Speicherkompartimenten findet nicht statt. Beides führt zu einer Unterrepräsentation des Wasserkanals an seinem Wirkungsort, der apikalen Plasmamembran. Sowohl die Expression als auch der Transport von AQP2 werden durch die Aktivierung der V2-Rezeptor-Signalkaskade gesteuert [157]. Um die Störung der apikalen Expression von AQP2 genau lokalisieren zu können muss der Mechanismus der Expression und des Transports verstanden werden. Diese Arbeit untersucht die Rolle von ANXA2 in diesem Zusammenhang.

### **ANXA2-Lokalisation in renalen Strukturen**

ANXA2 wurde bereits in Gefäßen [8, 143-145, 173-175], speziell auch in Nierengefäßen [176] und verschiedenen weiteren Strukturen der Niere beschrieben. Eine umfassende, speziesübergreifende Lokalisationsstudie existierte aber bisher nicht. In dieser Arbeit wurden alle Gefäßabschnitte der Niere in Mensch und Ratte auf die Abundanz von ANXA2 untersucht. Wie erwartet waren fast alle renalen Gefäße ANXA2-positiv. Die einzige Ausnahme bildeten die großen Nierenvenen, die Venae arcuatae und Venae interlobares. Sie exprimieren kein ANXA2. Auch die einzelnen Nephronabschnitte wurden systematisch auf ANXA2 untersucht. In Ratte, Maus und Mensch waren die äußere Membran der Bowmankapsel und die Mesangialzellen innerhalb der Glomeruli ANXA2-positiv. Das stimmt mit Ergebnissen aus kultivierten Mesangialzellen [177] und humanem Nierengewebe überein [176, 178]. Wir fanden die dünne und dicke Henle Schleife positiv für ANXA2. Daten aus der Zellkultur und humanem Nierengewebe unterstützen diese Ergebnisse [176, 179]. Mittels *Realtime* PCR fanden wir eine ANXA2-Expression im distalen Konvolut, die mittels Immunhistologie allerdings nicht nachweisbar war. Van de

Graaf et al. haben aber bereits an MDCK-Zellen gezeigt, dass ANXA2 am Transport von TRPV5 beteiligt ist. Dieser Kanal wird innerhalb des Nephrons ausschließlich im distalen Konvolut und Verbindungstubulus exprimiert [180]. Auch Domoto et al. haben ANXA2 im distalen Konvolut nachgewiesen [176]. Dies lässt vermuten, dass ANXA2 zwar im distalen Konvolut exprimiert wird, die Konzentration aber so gering ist, dass sie mittels Immunfluoreszenz nicht detektierbar ist. Im Vergleich zu anderen Strukturen der Niere ist ANXA2 hier also nur wenig exprimiert. Auch die Hauptzellen des Sammelrohrs zeigten in Mensch, Ratte und Maus die Expression von ANXA2. Das stimmt mit massenspektrometrischen Daten aus Rattengewebe und PCR-Analysen aus humanen Nieren überein [11, 176, 181, 182]. Im Vergleich zu den anderen renalen Strukturen war die Proteinabundanz von ANXA2 im Sammelrohr am stärksten.

### **Beziehung zwischen AQP2- und ANXA2-Expression**

Die Stimulation der V2-Rezeptoren im Sammelrohr von Brattleboro Ratten durch das AVP-Analogon dDAVP bewirkt eine dreifache Erhöhung der AQP2-Abundanz [158]. Parallel dazu zeigt die vorliegende Arbeit einen Anstieg der ANXA2-mRNA um 50% und bestätigt damit van Balkom et al. [182]. ANXA2 bindet kalziumabhängig an die spezifische dreidimensionale Struktur der 3'-UTR der eigenen [183] und weiterer mRNAs [184-188] und mediiert deren Transport in das perinukleäre Zytoplasma und ihre Verankerung am Zytoskelett. Daten von Mitarbeitern aus unserem Labor zeigen auch die Bindung von ANXA2 an die mRNA des NKCC2 in der dicken aufsteigenden Henle Schleife. Hinweisen, dass ANXA2 die AQP2-mRNA bindet, wird derzeit im Labor nachgegangen. Durch eine solche Bindung könnte ANXA2 an der Expressionssteigerung von AQP2 durch dDAVP-Stimulation beteiligt sein. Durch die Aktivierung der V2-Rezeptor-Signalkaskade steigen die cAMP-Spiegel in den Hauptzellen des Sammelrohrs. Über das *cAMP-response-element* (CRE) im AQP2-Gen werden vermehrt Transkripte gebildet [189-191]. Die ebenfalls durch dDAVP erhöhte Menge an ANXA2-Protein könnte die AQP2-mRNA binden und in das Zytosol zu den Ribosomen transportieren.

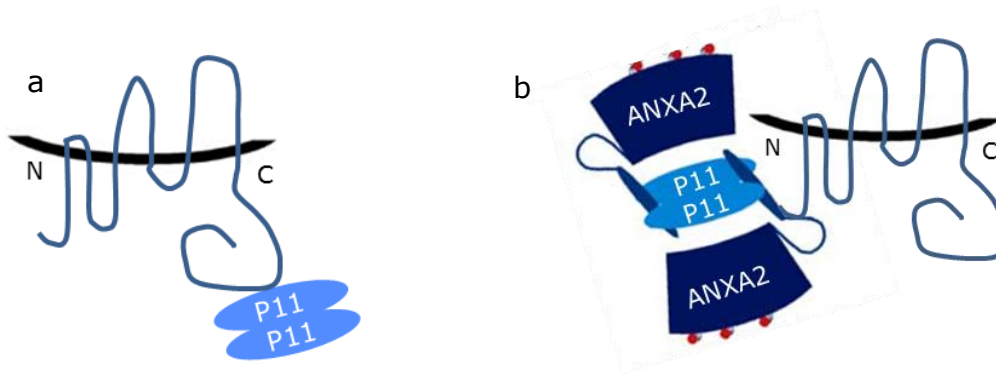
## **ANXA2 und P11 sind *in vivo* am Translokationsprozess von AQP2 beteiligt**

Zeitgleich zur Expression vermittelt die AVP-Signalkaskade den Transport von AQP2-Proteinen zur apikalen Plasmamembran. Die stimulierten V2-Rezeptoren aktivieren dabei das Protein  $G_{\alpha s}$ , das die Adenylatzyklase 6 zur Erhöhung der cAMP-Spiegel anregt und die Aktivierung der PKA verursacht. Neben der Phosphorylierung von AQP2 übernimmt die PKA multiple Aufgaben [32-34], infolge derer AQP2 aus zytosolischen Speicherkompartimenten zur apikalen Plasmamembran transportiert wird. Der Abbruch des AVP-Stimulus führt zur sofortigen, Clathrin-vermittelten Endozytose von AQP2 zurück zu Recyclingendosomen. Daran sind Zytoskelettelemente und mit diesen assoziierte Proteine beteiligt. Den Transport vom Syntheseort bis zu den Speicherkompartimenten im submembranösen Bereich übernehmen Mikrotubuli [36-38]. Da bisher kein Signalpeptid detektiert wurde, welches AQP2 in die apikale Plasmamembran dirigiert, könnten Transportproteine diesen Prozess steuern. Der Multiproteinkomplex um AQP2 beinhaltet, neben Aktin, Myosin und weiteren mit dem Zytoskelett assoziierten Proteinen, auch ANXA2 [11]. Wie alle Annexine bindet es kalziumabhängig an Phospholipide [192]. Es wurde bereits als Vesikeltransporter in verschiedenen Endo- und Exozytoseprozessen beschrieben [1-5] und das Heterotetramer, bestehend aus zwei P11- und zwei ANXA2-Molekülen, ist für den Transport einer kleinen Auswahl von Kanalproteinen essentiell [6-10]. Tamma et al. stimulierten kultivierte Sammelrohrzellen mit dem cAMP-steigernden Agens, Forskolin [12]. Daraufhin translozierten AQP2 und ANXA2 zur Plasmamembran. Darüber hinaus zeigten ihre *in vitro* Daten, dass ohne eine intakte P11-Bindestelle auf ANXA2 AQP2-tragende Vesikel nicht mit Membranen fusionieren. Die vorliegende Arbeit zeigt die Ko-Translokation von ANXA2, P11 und AQP2 nach Stimulation mit dem AVP-Analogen, dDAVP. Dies sind die ersten tierexperimentellen Daten, die eine Rolle des ANXA2-P11-Tetramers im Transport von AQP2 demonstrieren.

## **Das ANXA2-P11-Tetramer und P11 binden direkt an AQP2**

Die V2-Rezeptoraktivierung in Sammelrohrzellen verursacht eine intrazelluläre Kalziumoszillation [97, 98]. Die ist für die apikale Translokation von AQP2 essentiell [47, 48] und erhöht die Bindungsaffinität von ANXA2 zu Membranen

[99, 100]. Über seinen N-Terminus ist ANXA2 als Monomer in der Lage, zwei Membranen in räumliche Nähe zueinander zu bringen [87]. Auch in Form des Tetramers können die beiden ANXA2-Untereinheiten verschiedene Membranen binden und diese aggregieren [74]. Durch diese Fähigkeit und die zusätzliche Affinität zu F-Aktin ist ANXA2 an dynamischen Prozessen wie Vesikelfusion- und Trennung beteiligt. Binden die beiden ANXA2-Untereinheiten des Tetramers an die gleiche Membran, kann das P11-Dimer einen zusätzlichen Bindepartner einbringen [81]. Das wurde für den Transport von fünf verschiedenen Kanälen beschrieben [6-10]. Im Komplex um AQP2 wurde ANXA2 bereits zuvor nachgewiesen [11, 12]. Später zeigten Zwang et al., dass der C-Terminus von AQP2 ausreicht um diesen Komplex auszubilden [193]. Die vorliegende Arbeit bestätigt den Nachweis eines AQP2-ANXA2-Komplexes durch AQP2-Antikörper basierte Immunpräzipitation und kann ihn auch in einer ANXA2-Antikörper basierten Immunpräzipitation nachweisen. Eine direkte Bindung von ANXA2 an AQP2 konnte ich jedoch mittels *Peptid SPOT Arrays* nicht feststellen. Analog zu den oben zitierten Beispielen fanden wir allerdings eine direkte Interaktion zwischen P11 und AQP2 (Abb. 44a). Der hierfür verantwortliche Bereich liegt im C-Terminus von AQP2 innerhalb der Aminosäuresequenz 230-254. Dies bestätigt die Aussage von Zwang et al. [193], die den C-Terminus von AQP2 für die Interaktion mit ANXA2 verantwortlich machen. ANXA2 geht jedoch keine direkte Verbindung mit AQP2 ein, sondern wird über das Adapterprotein P11 an den C-Terminus von AQP2 gebunden. Überraschenderweise konnte diese Arbeit zusätzlich eine zweite Bindungsstelle am N-Terminus von AQP2 aufdecken, die nur bei gleichzeitigem Einsatz von P11 und ANXA2 von diesen gebunden wird (Aminosäuren 1-16; Abb. 44b). Einzeln waren die Proteine nicht in der Lage diese Bindung einzugehen. Vermutlich müssen sie dazu als Tetramer vorliegen. Ob ANXA2, P11 oder beide gemeinsam die Bindung an den N-Terminus von AQP2 vermitteln, bleibt hier offen. Entweder führt die Tetramerausbildung zu einer Konformationsänderung, die eines der beiden Proteine dazu befähigt, AQP2 zu binden, oder Teile beider Proteine vermitteln die Interaktion. Auf jeden Fall bindet ANXA2 nicht im Zuge von Endo- und Exozytoseprozessen unspezifisch an AQP2-tragende Vesikel. Es bindet vielmehr spezifisch über P11 den C-Terminus und, als Tetramer, den N-Terminus von AQP2. Das lässt eine direkte Verantwortlichkeit von ANXA2 für die Translokation von AQP2 vermuten.



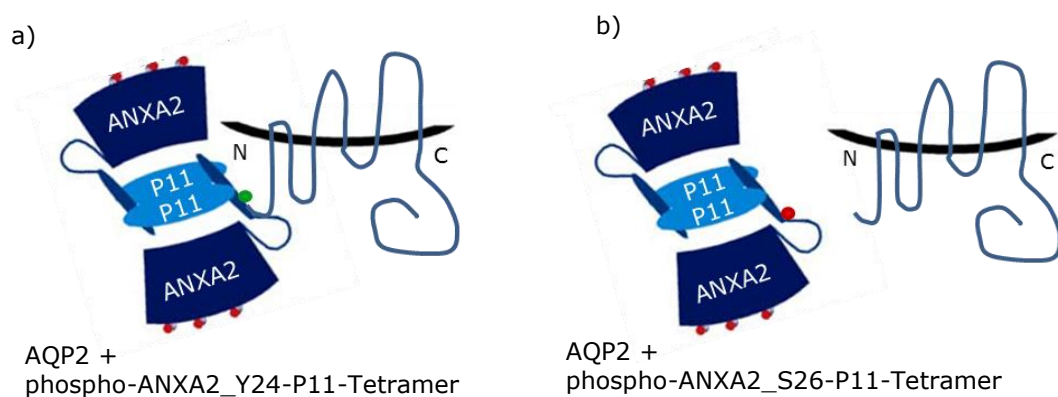
**Abb. 44. Schematische Darstellung der direkten Interaktion zwischen AQP2 und P11 bzw. AQP2 und ANXA2-P11-Tetramer**

*Peptid SPOT Arrays* und Ko-Immunpräzipitationen mit inhibitorischen Peptiden zeigen eine direkte Interaktion zwischen dem C-Terminus von AQP2 und P11 (a) bzw. zwischen dem N-Terminus von AQP2 und dem ANXA2-P11-Tetramer (b). Die grafische Darstellung von P11 und ANXA2 ist aus [88] übernommen.

### **Der Phosphostatus von ANXA2 spielt eine Rolle bei der Interaktion mit AQP2**

Die Bindungseigenschaften von ANXA2 können durch sich gegenseitig ausschließende Phosphorylierungen reguliert werden. ANXA2 besitzt drei Phosphorylierungsstellen, zwei Serinreste und einen Tyrosinrest [102, 108]. Bei der Frage, welcher Phosphorylierung welche Aufgabe zukommt, liefert die Fachliteratur jedoch kontroverse Ergebnisse. Auf einem Molekül sind entweder die Serinreste oder der Tyrosinrest phosphoryliert [194]. Eine Studie an Endothelien macht die Phosphorylierung am Tyrosin für den erfolgreichen Ablauf von Exozytoseprozessen verantwortlich [117]. Andere Studien behaupten, dass genau die gegensätzlichen Phosphorylierungen an den Serinen verschiedene Exozytoseprozesse begünstigen [112-116]. Generell bestimmt die Stelle der Phosphorylierung, ob ANXA2 zusammen mit P11 ein Tetramer ausbilden kann, oder ob das Tetramer durch sterische Hinderung zerfällt. Sammelrohrzellen, die mit dDAVP stimuliert werden, zeigen ansteigende Kalziumkonzentrationen sowie eine aktivierte PKA und eine aktivierte c-Src. Die PKA initiiert die Dephosphorylierung des S12 von ANXA2 [105-107], während die c-Src das Y24 phosphoryliert [108-110]. S26 wird gleichzeitig auf noch ungeklärtem Wege dephosphoryliert. Umgekehrt wird im Zuge einer negativen Rückkopplung Prostaglandin E2 (PGE2) freigesetzt. Das deaktiviert die PKA und aktiviert die PKC [195]. Die PKC phosphoryliert die Serinreste 12 und 26 von ANXA2. Die

Phosphorylierung am S12 bewirkt eine sterische Hinderung und den Zerfall des Tetramers [104]. Die vorliegende Arbeit zeigt phospho-ANXA2\_Y24 in einem gemeinsamen Komplex mit AQP2. Eine direkte Bindung wurde aber nicht nachgewiesen. Erst die Kombination aus den Konstrukten ANXA2\_Y24D und P11 interagiert mit dem N-Terminus von AQP2. In Bezug auf diese Bindung ist also kein Unterschied zwischen ANXA2 und dem phosphomimetischen Konstrukt ANXA2\_Y24D festzustellen. Daher ist zu vermuten, dass die Tetramerausbildung keiner Phosphorylierung von ANXA2 bedarf, und dass die Phosphorylierung des Y24 für die Bindung des Tetramers an AQP2 nicht störend, aber auch nicht notwendig ist. Das Konstrukt ANXA2\_S26D verhielt sich jedoch abweichend. Zwar bildete es, wie die anderen ANXA2 Konstrukte, ebenfalls keine direkte Bindung zu AQP2 aus, war aber auch in Kombination mit P11 nicht in der Lage, an den N-Terminus von AQP2 zu binden. Das lässt zwei Schlüsse zu. Zum einen könnte die Phosphorylierung am S26 die Ausbildung des ANXA2-P11-Tetramers verhindern. Diese Möglichkeit wird aber von Johnsson et al. ausgeschlossen [103]. Daher stört die Phosphorylierung von ANXA2 am S26 wahrscheinlich die Bindung des ANXA2-P11-Tetramers an den N-Terminus von AQP2.



**Abb. 45. Schematische Darstellung der Interaktion zwischen AQP2 und phospho-ANXA2-P11-Tetramer**

*Peptid SPOT Arrays* zeigen eine direkte Interaktion zwischen dem N-Terminus von AQP2 und dem Y24-phosphorylierten (grüner Punkt) ANXA2-P11-Tetramer (a). Die Phosphorylierung des ANXA2-P11-Tetramers am S26 (roter Punkt) verhindert die Interaktion mit dem N-Terminus von AQP2 (b). Die grafische Darstellung des ANXA2-P11-Tetramers ist aus [88] übernommen.

### **Spekulationen zur Rolle von ANXA2 bei der Translokation von AQP2**

Im Folgenden wird beleuchtet, inwiefern die Erkenntnisse aus der vorliegenden Arbeit die aktuelle Fachliteratur zur apikalen Translokation von AQP2 erweitern. Abbildung 46 fasst zusammen, welche Aufgaben ANXA2 hierbei übernehmen könnte.

Bei Wassermangel oder Hybernatriämie wird verstärkt AVP ausgeschüttet, welches an V2-Rezeptoren auf Sammelrohrzellen bindet. Die Adenylatcyclase 6 katalysiert die Bildung von cAMP. Das führt zur Aktivierung der PKA. Sie hat in diesem Zusammenhang multiple Aufgaben. Langfristig ist sie für die erhöhte Expression des AQP2-Gens, welches ein CRE beinhaltet, verantwortlich [189-191]. Parallel dazu steigt auch die Expression von ANXA2 an. Da ANXA2 an die 3'-UTR verschiedener mRNAs bindet, vermittelt es möglicherweise auch den Transport der AQP2-mRNA in das perinukleäre Zytoplasma und verankert sie mit dem Zytoskelett [184-188].

Im Ruhezustand befindet sich AQP2 hauptsächlich in Rab11-positiven Vesikeln des Speicherkompartiments [30, 31]. Das Netzwerk aus Aktinfilamenten arretiert die AQP2-tragenden Vesikel. Da das ANXA2-P11-Tetramer an AQP2 bindet und ANXA2 eine Aktinbindestelle im C-Terminus besitzt, könnte es die Interaktion zwischen AQP2 tragenden Vesikeln und Aktin vermitteln [196]. Unter physiologischen Kalziumkonzentrationen bündelt ANXA2 F-Aktin und fixiert dadurch Vesikel am Ort [197-199].

Die durch cAMP aktivierte PKA phosphoryliert AQP2 am S256 [32-34]. Das ist essentiell für seine apikale Translokation. Außerdem fördert sie die Ausbildung weiterer ANXA2-P11-Tetramere durch die Aktivierung der Phosphatase Calcineurin [106]. Calcineurin entfernt den Phosphatrest am S12 von ANXA2, der ansonsten die Komplexbildung von P11 und ANXA2 verhindert [105-107]. Die Interaktion mit ANXA2 verdeckt das Polyubiquitinierungssignal auf P11 und erhöht damit seine Halbwertszeit [96, 200]. Durch seine permanent aktive Konformation ist P11 zwar jederzeit in der Lage, an den C-Terminus von AQP2 zu binden. Ohne die Interaktion mit ANXA2 wird es jedoch schnell abgebaut. Das bedeutet, dass die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Bindung von P11 an den C-Terminus von AQP2 *in vivo* nicht längerfristig ohne die Ausbildung des Tetramers vorkommen kann. Die Aktivierung der Signalkaskade fördert aber die Tetramerbildung, wodurch sich die Anzahl der P11-Moleküle erhöht, die an AQP2



binden können. Um die in der vorliegenden Arbeit beschriebene zweite Bindungsstelle auf dem N-Terminus von AQP2 zu besetzen, müssen eventuell vorhandene Phosphatreste am S26 von den Tetrameren entfernt werden. Welche Phosphatase das übernimmt, ist unbekannt.

Zeitgleich phosphoryliert die PKA den Aktinzytoskelettregulator, RhoA, und deaktiviert ihn hiermit. Daraufhin depolymerisiert das submembranöse Netzwerk aus Aktinfasern, die physiologische Barriere wird beseitigt, AQP2-tragende Vesikel können passieren und werden durch die Bindung von ANXA2 an die Plasmamembran in räumlich Nähe zu dieser gebracht [39-41]. Die Verschmelzung der Vesikel mit der Membran wird dann wahrscheinlich von Fusionsproteinen übernommen [58].

Die Bindung des ANXA2-P11-Tetramers an Membranen fördert, möglicherweise durch eine Konformationsänderung, die Phosphorylierung am Y24 [201]. Daher sind viele ANXA2-Moleküle an der Plasmamembran Y24-phosphoryliert [56, 117, 202]. Neben weiteren Tyrosinkinasen können c-Src und der Insulinrezeptor diese Phosphorylierung vermitteln [203, 204]. Welche der Proteinkinasen in diesem Zusammenhang die Phosphorylierung übernimmt, ist allerdings nicht bekannt. Da c-Src aber durch Initiierung der V2-Rezeptor-Signalkaskade aktiviert wird, wäre sie ein potentieller Kandidat [205, 206]. Phospho-ANXA2\_Y24 aktiviert dann RhoA [203, 207], wahrscheinlich transportiert es den Zytoskelettregulator sogar zur Plasmamembran [208], woraufhin sich das submembranöse Netzwerk aus Aktinfasern wieder ausbildet. Gleichzeitig verhindert der Phosphatrest am Y24 die Interaktion von ANXA2 mit dem Clathrinkomplex und damit die ANXA2- und Clathrin- abhängige Endozytose von AQP2 [121].

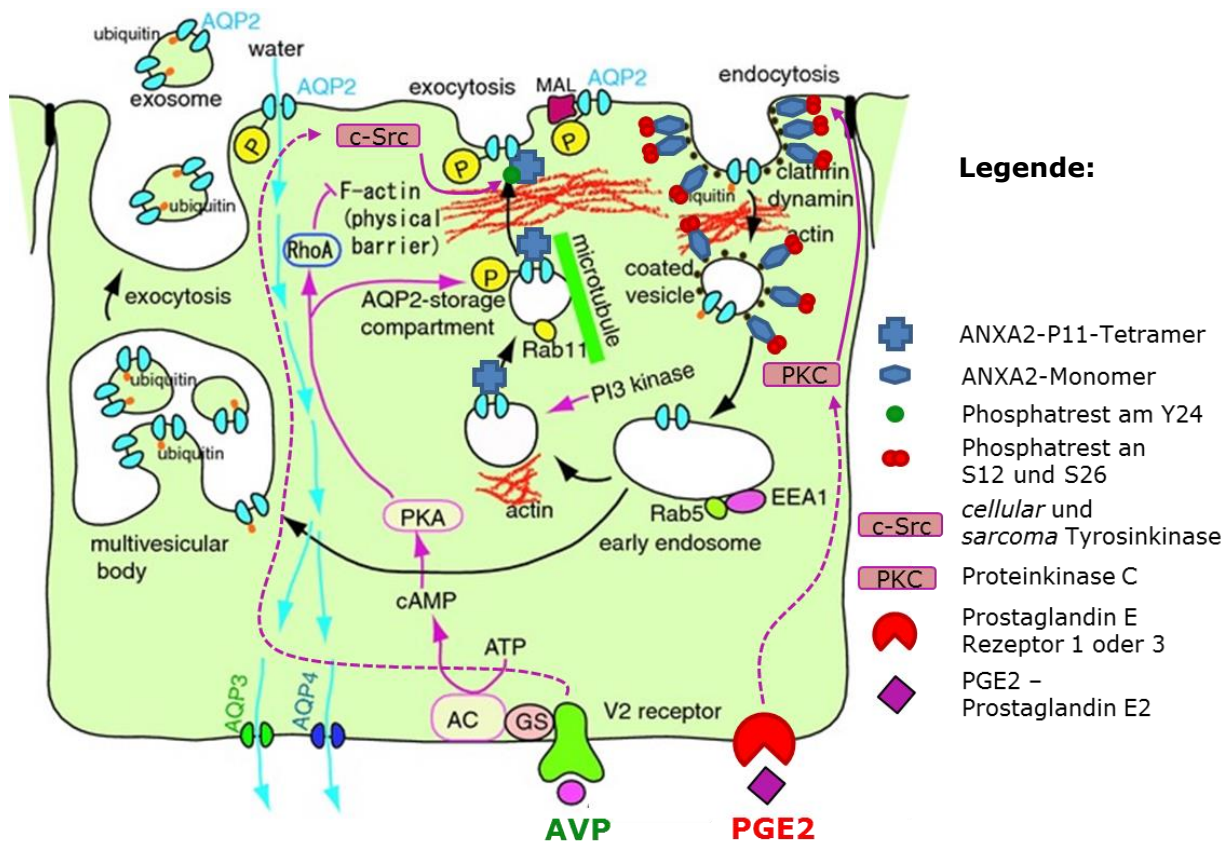
Die Aktivierung der V2-Rezeptor-Signalkaskade begünstigt also die Ausbildung des ANXA2-P11-Tetramers und dessen, in dieser Arbeit beschriebenen Interaktion, mit dem N- und C-Terminus von AQP2. Sie bewirkt die Lockerung der physiologischen Barriere aus F-Aktin, die Verbindung von AQP2-tragenden Vesikeln mit der Plasmamembran und verhindert die Endozytose von AQP2.

Bei Abklingen des AVP-Stimulus und Aktivierung der PKC wird apikales AQP2 sofort endozytiert [35]. Im Zuge der Urinkonzentrierung wird das Interstitium der inneren Medulla osmotisch aufgeladen. Auf diese erhöhten Osmolaritäten reagieren Interstitielle Zellen mit verstärkter Cox 2- (Cyklooxygenase-2) Synthese [209-214]. Cox 2 katalysiert die Bildung von Prostaglandinen aus

## Diskussion

Arachidonsäure. Das verursacht erhöhte Spiegel von PGE<sub>2</sub>, welches die basolateralen Rezeptoren, EP<sub>1</sub> und EP<sub>3</sub>, in Sammelrohrzellen aktiviert [215]. Infolge dessen wird die PKA deaktiviert und die PKC aktiviert [195]. Bei fehlendem AVP-Stimulus liegt das Gewicht damit klar auf der Seite der PKC. PKC phosphoryliert ANXA2 an den Serinresten 12 und 26. Gleichzeitig wird der Phosphatrest am Y24 auf noch unbekanntem Wege entfernt. Wie die vorliegende Arbeit zeigt, verhindert ein Phosphatrest am S26 von ANXA2, die Interaktion des ANXA2-P11-Tetramers mit AQP2. Ein Phosphatrest am S12 von ANXA2 hingegen bewirkt eine sterische Hinderung die zum Zerfall des Tetramers führt. Monomeres ANXA2 in Abwesenheit eines Phosphatrestes am Y24 vermittelt dann die clathrinabhängige Endozytose von AQP2, welches erst in frühe Endosomen, dann in Rab11-positive Recyclingendosomen transportiert wird [121, 216]. Einige wenige AQP2 Proteine werden ubiquitiniert und durch Exozytose mit dem Urin ausgeschieden [35, 42].

Das heißt, bei abklingendem AVP-Stimulus wird die PKC aktiviert. Sie phosphoryliert ANXA2 an den Serinresten 12 und 26. Zeitgleich wird der Phosphatrest am Y24 entfernt. Der Phosphatrest am S26 verhindert die Interaktion zwischen ANXA2-P11-Tetramer und AQP2. Der Phosphatrest am S12 führt zum Zerfall des ANXA2-P11-Tetramers. Monomeres P11 wird abgebaut, wobei das monomere ANXA2 ohne Phosphatrest am Y24 die clathrinabhängige Endozytose von AQP2-tragenden Vesikeln vermittelt. AQP2 liegt dann wieder hauptsächlich vesikulär im Speicherkompartiment vor bzw. wird ubiquitiniert und abgebaut.



**Abb. 46. Spekulationen zur Rolle von ANXA2 bei der Translokation von AQP2**

AC: Adenylatzyklase, AVP: L-Arginin Vasopressin, MAL: Myelin und lymphozytenassoziiertes Protein, PI3-Kinase: Phosphoinositid-3-Kinase, PKA: Proteinkinase A. Die Abbildung wurde von Takata et al. [42] übernommen, wobei die aufgelisteten Bausteine der Legende dazu gefügt wurden.

### Ausblick

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen zum ersten Mal eine direkte und spezifische Rolle von ANXA2 und P11 beim Transport von AQP2 im Sammelrohr. Diese Erkenntnisse schaffen die Basis für weitere Arbeiten. Nach Aktivierung der V2-Rezeptor-Signalkaskade steigt die Expression von AQP2 und ANXA2 an. Da ANXA2 die 3'-UTR verschiedener mRNAs bindet und deren Transport in das Zytoplasma vermittelt [184-188], sollte untersucht werden, ob ANXA2 auch den Transport der AQP2-mRNA mediiert.

Da ANXA2, je nach Phosphorylierungsgrad, unterschiedliche Fähigkeiten besitzt, ist es wichtig herauszufinden welche Proteinkinasen und Phosphatasen diese Phosphorylierungen im Zusammenhang der apikalen Translokation von AQP2

## Diskussion

katalysieren. Die im vorherigen Abschnitt genannten Proteinkinasen c-Src und PKC phosphorylieren ANXA2 in anderen Kontexten und wurden hier lediglich spekulativ erwähnt. Ob sie tatsächlich eine Rolle in der V2-Rezeptor aktivierten Translokation von AQP2 spielen, muss noch untersucht werden. Bis auf Calcineurin, welches den Phosphatrest des S12 von ANXA2 in anderem Kontext entfernt, sind keine weiteren Phosphatasen von ANXA2 bekannt. Auch diese müssen noch identifiziert werden. Anschließend wäre die Regulation dieser Enzyme zu untersuchen. Erst dann kann klar werden an welchem Ort in der Zelle und bei welchem Schritt der Signalkaskade die Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen von ANXA2 stattfinden. Publierte Daten liefern zwar Hinweise darauf, dass ANXA2 zu überwiegendem Teil Y24-phosphoryliert an der Plasmamembran vorliegt [56, 117, 202], in Sammelrohrzellen wurden aber bisher keine Studien zum Phosphostatus von ANXA2 durchgeführt. Die im vorherigen Abschnitt vorgenommene Zuordnung der ANXA2-Formen und deren Bindung an verschiedene Vesikel ist rein spekulativ. In welchem Kompartiment ANXA2 tatsächlich als Monomer oder Tetramer vorliegt bzw. welchen Phosphostatus es dort aufweist, muss erst durch experimentelle Daten ermittelt werden.

Neben ANXA2 wurde auch ANXA6 im Multiproteinkomplex um AQP2 entdeckt [11]. Zusätzlich wurde ANXA6 auf Clathrin-ummantelten Vesikeln und in verschiedenen Transportprozessen beschrieben [119, 217-220]. Zwar behaupten Tamma et al., dass die aktivierte V2-Rezeptor-Signalkaskade bei gehemmter Ausbildung des ANXA2-P11-Tetramers keine erhöhte Wasserdurchlässigkeit der Sammelrohrzellen erwirken kann [12], aufgrund der Eigenschaften von ANXA6 sollte jedoch trotzdem überprüft werden, inwiefern es redundant neben ANXA2 auftritt oder weitere Aufgaben beim Transport von AQP2 übernimmt.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Faure, A.V., et al., *Annexin 2 "secretion" accompanying exocytosis of chromaffin cells: possible mechanisms of annexin release*. *Exp Cell Res*, 2002. **276**(1): p. 79-89.
2. Liu, L., A.B. Fisher, and U.J. Zimmerman, *Lung annexin II promotes fusion of isolated lamellar bodies with liposomes*. *Biochim Biophys Acta*, 1995. **1259**(2): p. 166-72.
3. Nakata, T., K. Sobue, and N. Hirokawa, *Conformational change and localization of calpactin I complex involved in exocytosis as revealed by quick-freeze, deep-etch electron microscopy and immunocytochemistry*. *J Cell Biol*, 1990. **110**(1): p. 13-25.
4. Merrifield, C.J., et al., *Annexin 2 has an essential role in actin-based macropinocytic rocketing*. *Curr Biol*, 2001. **11**(14): p. 1136-41.
5. Grieve, A.G., S.E. Moss, and M.J. Hayes, *Annexin A2 at the interface of actin and membrane dynamics: a focus on its roles in endocytosis and cell polarization*. *Int J Cell Biol*, 2012. **2012**: p. 852430.
6. Okuse, K., et al., *Annexin II light chain regulates sensory neuron-specific sodium channel expression*. *Nature*, 2002. **417**(6889): p. 653-6.
7. Poon, W.Y., et al., *Identification of binding domains in the sodium channel Na(V)1.8 intracellular N-terminal region and annexin II light chain p11*. *FEBS Lett*, 2004. **558**(1-3): p. 114-8.
8. van de Graaf, S.F., et al., *Functional expression of the epithelial Ca(2+) channels (TRPV5 and TRPV6) requires association of the S100A10-annexin 2 complex*. *EMBO J*, 2003. **22**(7): p. 1478-87.
9. Donier, E., et al., *Annexin II light chain p11 promotes functional expression of acid-sensing ion channel ASIC1a*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(46): p. 38666-72.
10. Svenningsson, P., et al., *Alterations in 5-HT1B receptor function by p11 in depression-like states*. *Science*, 2006. **311**(5757): p. 77-80.
11. Noda, Y., et al., *Identification of a multiprotein "motor" complex binding to water channel aquaporin-2*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **330**(4): p. 1041-7.
12. Tamma, G., et al., *Functional involvement of Annexin-2 in cAMP induced AQP2 trafficking*. *Pflugers Arch*, 2008. **456**(4): p. 729-36.
13. Merlet-Benichou, C., et al., *Nephron number: variability is the rule. Causes and consequences*. *Lab Invest*, 1999. **79**(5): p. 515-27.
14. Ozgo, M., et al., *Urinary excretion of low molecular weight proteins in goats during the neonatal period*. *J Physiol Pharmacol*, 2009. **60 Suppl 3**: p. 119-25.
15. Kriz, W. and L. Bankir, *A standard nomenclature for structures of the kidney. The Renal Commission of the International Union of Physiological Sciences (IUPS)*. *Kidney Int*, 1988. **33**(1): p. 1-7.
16. Benninghoff, A.u.D., D., ed. *Anatomie, Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. 16 ed. Vol. 1. 2002, Urban und Fischer.
17. Mutig, K., et al., *Vasopressin V2 receptor expression along rat, mouse, and human renal epithelia with focus on TAL*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007. **293**(4): p. F1166-77.
18. Boone, M. and P.M. Deen, *Physiology and pathophysiology of the vasopressin-regulated renal water reabsorption*. *Pflugers Arch*, 2008. **456**(6): p. 1005-24.

19. Brown, D., *The ins and outs of aquaporin-2 trafficking*. Am J Physiol Renal Physiol, 2003. **284**(5): p. F893-901.
20. Nielsen, S., et al., *Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(4): p. 1013-7.
21. Nielsen, S., et al., *Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine*. Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 205-44.
22. Valenti, G., et al., *Minireview: aquaporin 2 trafficking*. Endocrinology, 2005. **146**(12): p. 5063-70.
23. Nielsen, S., et al., *Cellular and subcellular localization of the vasopressin-regulated urea transporter in rat kidney*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(11): p. 5495-500.
24. Karakashian, A., et al., *Cloning and characterization of two new isoforms of the rat kidney urea transporter: UT-A3 and UT-A4*. J Am Soc Nephrol, 1999. **10**(2): p. 230-7.
25. Stewart, G.S., et al., *Vasopressin regulation of the renal UT-A3 urea transporter*. Am J Physiol Renal Physiol, 2009. **296**(3): p. F642-8.
26. Gimenez, I. and B. Forbush, *Short-term stimulation of the renal Na-K-Cl cotransporter (NKCC2) by vasopressin involves phosphorylation and membrane translocation of the protein*. J Biol Chem, 2003. **278**(29): p. 26946-51.
27. Ortiz, P.A., *cAMP increases surface expression of NKCC2 in rat thick ascending limbs: role of VAMP*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **290**(3): p. F608-16.
28. Morgan, T. and R.W. Berliner, *Permeability of the loop of Henle, vasa recta, and collecting duct to water, urea, and sodium*. Am J Physiol, 1968. **215**(1): p. 108-15.
29. Morgan, T., F. Sakai, and R.W. Berliner, *In vitro permeability of medullary collecting ducts to water and urea*. Am J Physiol, 1968. **214**(3): p. 574-81.
30. Barile, M., et al., *Large scale protein identification in intracellular aquaporin-2 vesicles from renal inner medullary collecting duct*. Mol Cell Proteomics, 2005. **4**(8): p. 1095-106.
31. Nedvetsky, P.I., et al., *A Role of myosin Vb and Rab11-FIP2 in the aquaporin-2 shuttle*. Traffic, 2007. **8**(2): p. 110-23.
32. Moeller, H.B., et al., *Role of multiple phosphorylation sites in the COOH-terminal tail of aquaporin-2 for water transport: evidence against channel gating*. Am J Physiol Renal Physiol, 2009. **296**(3): p. F649-57.
33. Hoffert, J.D., et al., *Dynamics of aquaporin-2 serine-261 phosphorylation in response to short-term vasopressin treatment in collecting duct*. Am J Physiol Renal Physiol, 2007. **292**(2): p. F691-700.
34. Hoffert, J.D., et al., *Quantitative phosphoproteomics of vasopressin-sensitive renal cells: regulation of aquaporin-2 phosphorylation at two sites*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(18): p. 7159-64.
35. Kamsteeg, E.J., et al., *Short-chain ubiquitination mediates the regulated endocytosis of the aquaporin-2 water channel*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(48): p. 18344-9.
36. Valenti, G., J.S. Hugon, and J. Bourguet, *To what extent is microtubular network involved in antidiuretic response?* Am J Physiol, 1988. **255**(6 Pt 2): p. F1098-106.
37. Bourguet, J., et al., *ADH-induced water permeability: what role for the microtubular network?* Comp Biochem Physiol A Comp Physiol, 1988. **90**(4): p. 669-72.

38. Marples, D., et al., *Dynein and dynactin colocalize with AQP2 water channels in intracellular vesicles from kidney collecting duct*. Am J Physiol, 1998. **274**(2 Pt 2): p. F384-94.
39. Tamma, G., et al., *Rho inhibits cAMP-induced translocation of aquaporin-2 into the apical membrane of renal cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2001. **281**(6): p. F1092-101.
40. Klusmann, E., et al., *An inhibitory role of Rho in the vasopressin-mediated translocation of aquaporin-2 into cell membranes of renal principal cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(23): p. 20451-7.
41. Tajika, Y., et al., *Differential regulation of AQP2 trafficking in endosomes by microtubules and actin filaments*. Histochem Cell Biol, 2005. **124**(1): p. 1-12.
42. Takata, K., et al., *Localization and trafficking of aquaporin 2 in the kidney*. Histochem Cell Biol, 2008. **130**(2): p. 197-209.
43. Champigneulle, A., et al., *V2-like vasopressin receptor mobilizes intracellular Ca<sup>2+</sup> in rat medullary collecting tubules*. Am J Physiol, 1993. **265**(1 Pt 2): p. F35-45.
44. Ecelbarger, C.A., et al., *Evidence for dual signaling pathways for V2 vasopressin receptor in rat inner medullary collecting duct*. Am J Physiol, 1996. **270**(4 Pt 2): p. F623-33.
45. Maeda, Y., et al., *Vasopressin and oxytocin receptors coupled to Ca<sup>2+</sup> mobilization in rat inner medullary collecting duct*. Am J Physiol, 1993. **265**(1 Pt 2): p. F15-25.
46. Star, R.A., et al., *Calcium and cyclic adenosine monophosphate as second messengers for vasopressin in the rat inner medullary collecting duct*. J Clin Invest, 1988. **81**(6): p. 1879-88.
47. Yip, K.P., *Coupling of vasopressin-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and apical exocytosis in perfused rat kidney collecting duct*. J Physiol, 2002. **538**(Pt 3): p. 891-9.
48. Chou, C.L., et al., *Regulation of aquaporin-2 trafficking by vasopressin in the renal collecting duct. Roles of ryanodine-sensitive Ca<sup>2+</sup> stores and calmodulin*. J Biol Chem, 2000. **275**(47): p. 36839-46.
49. Chou, C.L., S.I. Rapko, and M.A. Knepper, *Phosphoinositide signaling in rat inner medullary collecting duct*. Am J Physiol, 1998. **274**(3 Pt 2): p. F564-72.
50. Chou, C.L., et al., *Non-muscle myosin II and myosin light chain kinase are downstream targets for vasopressin signaling in the renal collecting duct*. J Biol Chem, 2004. **279**(47): p. 49026-35.
51. Balasubramanian, L., J.S. Sham, and K.P. Yip, *Calcium signaling in vasopressin-induced aquaporin-2 trafficking*. Pflugers Arch, 2008. **456**(4): p. 747-54.
52. Hoffert, J.D., T. Pisitkun, and M.A. Knepper, *Phosphoproteomics of vasopressin signaling in the kidney*. Expert Rev Proteomics, 2011. **8**(2): p. 157-63.
53. Sarkar, S., C. Kantara, and P. Singh, *Clathrin mediates endocytosis of progastrin and activates MAPKs: role of cell surface annexin A2*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2012. **302**(7): p. G712-22.
54. Fang, Y.T., et al., *Interferon-gamma stimulates p11-dependent surface expression of annexin A2 in lung epithelial cells to enhance phagocytosis*. J Cell Physiol, 2012. **227**(6): p. 2775-87.
55. Valapala, M. and J.K. Vishwanatha, *Lipid raft endocytosis and exosomal transport facilitate extracellular trafficking of annexin A2*. J Biol Chem, 2011. **286**(35): p. 30911-25.

56. Morel, E. and J. Gruenberg, *Annexin A2 binding to endosomes and functions in endosomal transport are regulated by tyrosine 23 phosphorylation*. J Biol Chem, 2009. **284**(3): p. 1604-11.
57. Moss, S.E. and R.O. Morgan, *The annexins*. Genome Biol, 2004. **5**(4): p. 219.
58. Gerke, V. and S.E. Moss, *Annexins: from structure to function*. Physiol Rev, 2002. **82**(2): p. 331-71.
59. Raynal, P. and H.B. Pollard, *Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1197**(1): p. 63-93.
60. Seaton, B.A. and J.R. Dedman, *Annexins*. Biometals, 1998. **11**(4): p. 399-404.
61. Swairjo, M.A. and B.A. Seaton, *Annexin structure and membrane interactions: a molecular perspective*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1994. **23**: p. 193-213.
62. Swairjo, M.A., et al., *Ca(2+)-bridging mechanism and phospholipid head group recognition in the membrane-binding protein annexin V*. Nat Struct Biol, 1995. **2**(11): p. 968-74.
63. Weng, X., et al., *Crystal structure of human annexin I at 2.5 Å resolution*. Protein Sci, 1993. **2**(3): p. 448-58.
64. Ayala-Sanmartin, J., J.P. Henry, and L.A. Pradel, *Cholesterol regulates membrane binding and aggregation by annexin 2 at submicromolar Ca(2+) concentration*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1510**(1-2): p. 18-28.
65. Hayes, M.J., et al., *Annexin 2 binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on endocytic vesicles is regulated by the stress response pathway*. J Biol Chem, 2004. **279**(14): p. 14157-64.
66. Rescher, U., et al., *Annexin 2 is a phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding protein recruited to actin assembly sites at cellular membranes*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 16): p. 3473-80.
67. Johnsson, N., V. Gerke, and K. Weber, *P36, member of the CA2+/lipid binding proteins (annexins, calpactins, lipocortins) and its complex with P11; molecular aspects*. Prog Clin Biol Res, 1990. **349**: p. 123-33.
68. Rosengarth, A., et al., *Folding energetics of ligand binding proteins II. Cooperative binding of Ca2+ to annexin I*. J Mol Biol, 2001. **306**(4): p. 825-35.
69. Marenholz, I., C.W. Heizmann, and G. Fritz, *S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature)*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **322**(4): p. 1111-22.
70. Marenholz, I., R.C. Lovering, and C.W. Heizmann, *An update of the S100 nomenclature*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1763**(11): p. 1282-3.
71. Zimmer, D.B., et al., *The S100 protein family: history, function, and expression*. Brain Res Bull, 1995. **37**(4): p. 417-29.
72. Gerke, V. and K. Weber, *The regulatory chain in the p36-kD substrate complex of viral tyrosine-specific protein kinases is related in sequence to the S-100 protein of glial cells*. EMBO J, 1985. **4**(11): p. 2917-20.
73. Rety, S., et al., *The crystal structure of a complex of p11 with the annexin II N-terminal peptide*. Nat Struct Biol, 1999. **6**(1): p. 89-95.
74. Lambert, O., et al., *Structural analysis of junctions formed between lipid membranes and several annexins by cryo-electron microscopy*. J Mol Biol, 1997. **272**(1): p. 42-55.



75. Lewit-Bentley, A., et al., *S100-annexin complexes: some insights from structural studies*. Cell Biol Int, 2000. **24**(11): p. 799-802.
76. Kube, E., et al., *Protein-protein interaction studied by site-directed mutagenesis. Characterization of the annexin II-binding site on p11, a member of the S100 protein family*. J Biol Chem, 1992. **267**(20): p. 14175-82.
77. Becker, T., K. Weber, and N. Johnsson, *Protein-protein recognition via short amphiphilic helices; a mutational analysis of the binding site of annexin II for p11*. EMBO J, 1990. **9**(13): p. 4207-13.
78. Zobiack, N., V. Gerke, and U. Rescher, *Complex formation and submembranous localization of annexin 2 and S100A10 in live HepG2 cells*. FEBS Lett, 2001. **500**(3): p. 137-40.
79. Osborn, M., et al., *The submembranous location of p11 and its interaction with the p36 substrate of pp60 src kinase in situ*. Exp Cell Res, 1988. **175**(1): p. 81-96.
80. Semich, R., et al., *The p36 substrate of pp60src kinase is located at the cytoplasmic surface of the plasma membrane of fibroblasts; an immunoelectron microscopic analysis*. Eur J Cell Biol, 1989. **50**(2): p. 313-23.
81. Menke, M., et al., *The molecular arrangement of membrane-bound annexin A2-S100A10 tetramer as revealed by scanning force microscopy*. Chembiochem, 2004. **5**(7): p. 1003-6.
82. Girard, C., et al., *p11, an annexin II subunit, an auxiliary protein associated with the background K<sup>+</sup> channel, TASK-1*. EMBO J, 2002. **21**(17): p. 4439-48.
83. Renigunta, V., et al., *The retention factor p11 confers an endoplasmic reticulum-localization signal to the potassium channel TASK-1*. Traffic, 2006. **7**(2): p. 168-81.
84. Merrifield, C.J., et al., *Endocytic vesicles move at the tips of actin tails in cultured mast cells*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(1): p. 72-4.
85. Creutz, C.E., C.J. Pazoles, and H.B. Pollard, *Identification and purification of an adrenal medullary protein (synexin) that causes calcium-dependent aggregation of isolated chromaffin granules*. J Biol Chem, 1978. **253**(8): p. 2858-66.
86. Weber, T., et al., *SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion*. Cell, 1998. **92**(6): p. 759-72.
87. Zibouche, M., et al., *The N-terminal domain of annexin 2 serves as a secondary binding site during membrane bridging*. J Biol Chem, 2008. **283**(32): p. 22121-7.
88. Rescher, U. and V. Gerke, *S100A10/p11: family, friends and functions*. Pflugers Arch, 2008. **455**(4): p. 575-82.
89. Hayes, M.J. and S.E. Moss, *Annexin 2 has a dual role as regulator and effector of v-Src in cell transformation*. J Biol Chem, 2009. **284**(15): p. 10202-10.
90. Zobiack, N., et al., *The annexin 2/S100A10 complex controls the distribution of transferrin receptor-containing recycling endosomes*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(12): p. 4896-908.
91. Mayran, N., R.G. Parton, and J. Gruenberg, *Annexin II regulates multivesicular endosome biogenesis in the degradation pathway of animal cells*. EMBO J, 2003. **22**(13): p. 3242-53.
92. Harder, T., et al., *Specific release of membrane-bound annexin II and cortical cytoskeletal elements by sequestration of membrane cholesterol*. Mol Biol Cell, 1997. **8**(3): p. 533-45.

93. Zeuschner, D., W. Stoorvogel, and V. Gerke, *Association of annexin 2 with recycling endosomes requires either calcium- or cholesterol-stabilized membrane domains*. Eur J Cell Biol, 2001. **80**(8): p. 499-507.
94. Creutz, C.E., *The annexins and exocytosis*. Science, 1992. **258**(5084): p. 924-31.
95. Jacob, R., et al., *Annexin II is required for apical transport in polarized epithelial cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(5): p. 3680-4.
96. He, K.L., et al., *Endothelial cell annexin A2 regulates polyubiquitination and degradation of its binding partner S100A10/p11*. J Biol Chem, 2008. **283**(28): p. 19192-200.
97. Yip, K.P. and J.S. Sham, *Mechanisms of vasopressin-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> oscillations in rat inner medullary collecting duct*. Am J Physiol Renal Physiol, 2011. **300**(2): p. F540-8.
98. Pisitkun, T., et al., *Akt and ERK1/2 pathways are components of the vasopressin signaling network in rat native IMCD*. Am J Physiol Renal Physiol, 2008. **295**(4): p. F1030-43.
99. Jost, M., K. Weber, and V. Gerke, *Annexin II contains two types of Ca(2+)-binding sites*. Biochem J, 1994. **298 Pt 3**: p. 553-9.
100. Thiel, C., M. Osborn, and V. Gerke, *The tight association of the tyrosine kinase substrate annexin II with the submembranous cytoskeleton depends on intact p11- and Ca(2+)-binding sites*. J Cell Sci, 1992. **103 (Pt 3)**: p. 733-42.
101. Rosengarth, A. and H. Luecke, *A calcium-driven conformational switch of the N-terminal and core domains of annexin A1*. J Mol Biol, 2003. **326**(5): p. 1317-25.
102. Gould, K.L., et al., *The protein-tyrosine kinase substrate p36 is also a substrate for protein kinase C in vitro and in vivo*. Mol Cell Biol, 1986. **6**(7): p. 2738-44.
103. Johnsson, N., et al., *Functionally distinct serine phosphorylation sites of p36, the cellular substrate of retroviral protein kinase; differential inhibition of reassociation with p11*. EMBO J, 1986. **5**(13): p. 3455-60.
104. Jost, M. and V. Gerke, *Mapping of a regulatory important site for protein kinase C phosphorylation in the N-terminal domain of annexin II*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1313**(3): p. 283-9.
105. Muimo, R., *Regulation of CFTR function by annexin A2-S100A10 complex in health and disease*. Gen Physiol Biophys, 2009. **28 Spec No Focus**: p. F14-9.
106. Borthwick, L.A., et al., *The annexin 2-S100A10 complex and its association with TRPV6 is regulated by cAMP/PKA/CnA in airway and gut epithelia*. Cell Calcium, 2008. **44**(2): p. 147-57.
107. Borthwick, L.A., et al., *The formation of the cAMP/protein kinase A-dependent annexin 2-S100A10 complex with cystic fibrosis conductance regulator protein (CFTR) regulates CFTR channel function*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(9): p. 3388-97.
108. Radke, K. and G.S. Martin, *Transformation by Rous sarcoma virus: effects of src gene expression on the synthesis and phosphorylation of cellular polypeptides*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(10): p. 5212-6.
109. Glenney, J.R., Jr., *Phosphorylation of p36 in vitro with pp60src. Regulation by Ca<sup>2+</sup> and phospholipid*. FEBS Lett, 1985. **192**(1): p. 79-82.
110. Glenney, J.R., Jr. and B.F. Tack, *Amino-terminal sequence of p36 and associated p10: identification of the site of tyrosine phosphorylation and homology with S-100*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(23): p. 7884-8.

111. Johnstone, S.A., I. Hubaishy, and D.M. Waisman, *Phosphorylation of annexin II tetramer by protein kinase C inhibits aggregation of lipid vesicles by the protein*. J Biol Chem, 1992. **267**(36): p. 25976-81.
112. Sarafian, T., et al., *The participation of annexin II (calpactin I) in calcium-evoked exocytosis requires protein kinase C*. J Cell Biol, 1991. **114**(6): p. 1135-47.
113. Chasserot-Golaz, S., et al., *Annexin II in exocytosis: catecholamine secretion requires the translocation of p36 to the subplasmalemmal region in chromaffin cells*. J Cell Biol, 1996. **133**(6): p. 1217-36.
114. Graham, M.E., V. Gerke, and R.D. Burgoyne, *Modification of annexin II expression in PC12 cell lines does not affect Ca(2+)-dependent exocytosis*. Mol Biol Cell, 1997. **8**(3): p. 431-42.
115. Konig, J., et al., *The annexin II-p11 complex is involved in regulated exocytosis in bovine pulmonary artery endothelial cells*. J Biol Chem, 1998. **273**(31): p. 19679-84.
116. Knop, M., et al., *Rab3D and annexin A2 play a role in regulated secretion of vWF, but not tPA, from endothelial cells*. EMBO J, 2004. **23**(15): p. 2982-92.
117. Deora, A.B., et al., *An annexin 2 phosphorylation switch mediates p11-dependent translocation of annexin 2 to the cell surface*. J Biol Chem, 2004. **279**(42): p. 43411-8.
118. Jost, M., et al., *Identification and characterization of a novel type of annexin-membrane interaction: Ca<sup>2+</sup> is not required for the association of annexin II with early endosomes*. J Cell Sci, 1997. **110 ( Pt 2)**: p. 221-8.
119. Turpin, E., et al., *In adrenocortical tissue, annexins II and VI are attached to clathrin coated vesicles in a calcium-independent manner*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1402**(2): p. 115-30.
120. Hong, Y.H., et al., *Structural elucidation of the protein- and membrane-binding properties of the N-terminal tail domain of human annexin II*. J Biochem, 2003. **134**(3): p. 427-32.
121. Creutz, C.E. and S.L. Snyder, *Interactions of annexins with the mu subunits of the clathrin assembly proteins*. Biochemistry, 2005. **44**(42): p. 13795-806.
122. Hubaishy, I., et al., *Modulation of annexin II tetramer by tyrosine phosphorylation*. Biochemistry, 1995. **34**(44): p. 14527-34.
123. Yonglithipagon, P., et al., *Up-regulation of annexin A2 in cholangiocarcinoma caused by Opisthorchis viverrini and its implication as a prognostic marker*. Int J Parasitol, 2010. **40**(10): p. 1203-12.
124. Juul, K.V., *The evolutionary origin of the vasopressin/V2-type receptor/aquaporin axis and the urine-concentrating mechanism*. Endocrine, 2012.
125. Trudel, E. and C.W. Bourque, *Circadian modulation of osmoregulated firing in rat supraoptic nucleus neurones*. J Neuroendocrinol, 2012. **24**(4): p. 577-86.
126. Schmale, H. and D. Richter, *Single base deletion in the vasopressin gene is the cause of diabetes insipidus in Brattleboro rats*. Nature, 1984. **308**(5961): p. 705-9.
127. Lee, J. and P.G. Williams, *The effect of vasopressin (Pitressin) administration and dehydration on the concentration of solutes in renal fluids of rats with and without hereditary hypothalamic diabetes insipidus*. J Physiol, 1972. **220**(3): p. 729-43.

128. Bia, M.J., S. Dewitt, and J.N. Forrest, Jr., *Dissociation between plasma, urine, and renal papillary cyclic AMP content following vasopressin and DDAVP*. *Am J Physiol*, 1979. **237**(3): p. F218-25.
129. Moses, A.M. and R. Coulson, *Augmentation by chlorpropamide of 1-deamino-8-D-arginine vasopressin-induced antidiuresis and stimulation of renal medullary adenylate cyclase and accumulation of adenosine 3',5'-monophosphate*. *Endocrinology*, 1980. **106**(3): p. 967-72.
130. Kimbrough, R.D., Jr., et al., *Synthesis and biological properties of 1-desamino-8-lysine-vasopressin*. *J Biol Chem*, 1963. **238**: p. 1411-4.
131. Walter, R., J. Rudinger, and I.L. Schwartz, *Chemistry and structure-activity relations of the antidiuretic hormones*. *Am J Med*, 1967. **42**(5): p. 653-77.
132. Sawyer, W.H., et al., *Structural changes in the arginine vasopressin molecule that enhance antidiuretic activity and specificity*. *Endocrinology*, 1974. **94**(4): p. 1106-15.
133. Paliege, A., et al., *Group VIA phospholipase A2 is a target for vasopressin signaling in the thick ascending limb*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012. **302**(7): p. F865-74.
134. Oksche, A., et al., *Late endosomal/lysosomal targeting and lack of recycling of the ligand-occupied endothelin B receptor*. *Mol Pharmacol*, 2000. **57**(6): p. 1104-13.
135. Briant, D.J., et al., *Rapid identification of linear protein domain binding motifs using peptide SPOT arrays*. *Methods Mol Biol*, 2009. **570**: p. 175-85.
136. Wenschuh, H., et al., *Coherent membrane supports for parallel microsynthesis and screening of bioactive peptides*. *Biopolymers*, 2000. **55**(3): p. 188-206.
137. Stefan, E., et al., *Compartmentalization of cAMP-dependent signaling by phosphodiesterase-4D is involved in the regulation of vasopressin-mediated water reabsorption in renal principal cells*. *J Am Soc Nephrol*, 2007. **18**(1): p. 199-212.
138. Frank, R., *The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications*. *J Immunol Methods*, 2002. **267**(1): p. 13-26.
139. Kramer, A. and J. Schneider-Mergener, *Synthesis and screening of peptide libraries on continuous cellulose membrane supports*. *Methods Mol Biol*, 1998. **87**: p. 25-39.
140. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
141. Winter, N., *Methoden der Biophysikalischen Chemie*, in *Studienbücher Chemie*, Teubner, Editor 1998.
142. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
143. Hullin, F., et al., *Effect of dexamethasone on prostaglandin synthesis and on lipocortin status in human endothelial cells. Inhibition of prostaglandin I2 synthesis occurring without alteration of arachidonic acid liberation and of lipocortin synthesis*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(6): p. 3506-13.
144. Patte, C., et al., *Possible involvement of a lipocortin in the initiation of DNA synthesis by human endothelial cells*. *Exp Cell Res*, 1991. **197**(1): p. 12-20.

145. Hajjar, K.A., et al., *Interaction of the fibrinolytic receptor, annexin II, with the endothelial cell surface. Essential role of endonexin repeat 2*. J Biol Chem, 1996. **271**(35): p. 21652-9.
146. Cheng, C.W., et al., *Calcium-binding proteins annexin A2 and S100A6 are sensors of tubular injury and recovery in acute renal failure*. Kidney Int, 2005. **68**(6): p. 2694-703.
147. Harder, T. and V. Gerke, *The subcellular distribution of early endosomes is affected by the annexin II2p11(2) complex*. J Cell Biol, 1993. **123**(5): p. 1119-32.
148. Scherer, P.E., et al., *Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo*. J Biol Chem, 1997. **272**(46): p. 29337-46.
149. Vogel, U., K. Sandvig, and B. van Deurs, *Expression of caveolin-1 and polarized formation of invaginated caveolae in Caco-2 and MDCK II cells*. J Cell Sci, 1998. **111 ( Pt 6)**: p. 825-32.
150. Backes, P., et al., *Role of annexin A2 in the production of infectious hepatitis C virus particles*. J Virol, 2010. **84**(11): p. 5775-89.
151. Wang, C.Y., et al., *Glycogen synthase kinase-3 and Omi/HtrA2 induce annexin A2 cleavage followed by cell cycle inhibition and apoptosis*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(19): p. 4153-61.
152. Yamada, A., et al., *Requirement of nectin, but not cadherin, for formation of claudin-based tight junctions in annexin II-knockdown MDCK cells*. Oncogene, 2006. **25**(37): p. 5085-102.
153. Gamba, G., et al., *Molecular cloning, primary structure, and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney*. J Biol Chem, 1994. **269**(26): p. 17713-22.
154. Igarashi, P., et al., *Cloning, embryonic expression, and alternative splicing of a murine kidney-specific Na-K-Cl cotransporter*. Am J Physiol, 1995. **269**(3 Pt 2): p. F405-18.
155. Fushimi, K., et al., *Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule*. Nature, 1993. **361**(6412): p. 549-52.
156. Sasaki, S., et al., *Cloning, characterization, and chromosomal mapping of human aquaporin of collecting duct*. J Clin Invest, 1994. **93**(3): p. 1250-6.
157. Promeneur, D., et al., *Vasopressin V(2)-receptor-dependent regulation of AQP2 expression in Brattleboro rats*. Am J Physiol Renal Physiol, 2000. **279**(2): p. F370-82.
158. DiGiovanni, S.R., et al., *Regulation of collecting duct water channel expression by vasopressin in Brattleboro rat*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(19): p. 8984-8.
159. Joo, K.W., et al., *Antidiuretic action of oxytocin is associated with increased urinary excretion of aquaporin-2*. Nephrol Dial Transplant, 2004. **19**(10): p. 2480-6.
160. Zhai, J., et al., *Proteomic characterization of lipid raft proteins in amyotrophic lateral sclerosis mouse spinal cord*. FEBS J, 2009. **276**(12): p. 3308-23.
161. Gramolini, A.O., et al., *Comparative proteomics profiling of a phospholamban mutant mouse model of dilated cardiomyopathy reveals progressive intracellular stress responses*. Mol Cell Proteomics, 2008. **7**(3): p. 519-33.

162. LeBouder, F., et al., *Annexin II incorporated into influenza virus particles supports virus replication by converting plasminogen into plasmin*. J Virol, 2008. **82**(14): p. 6820-8.
163. Lederer, C.W., et al., *Pathways and genes differentially expressed in the motor cortex of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis*. BMC Genomics, 2007. **8**: p. 26.
164. Mathur, S.N., K.R. Watt, and F.J. Field, *Regulation of intestinal NPC1L1 expression by dietary fish oil and docosahexaenoic acid*. J Lipid Res, 2007. **48**(2): p. 395-404.
165. Zhang, Q. and W.X. Wu, *Separate and synergistic effect of progesterone and estradiol on induction of annexin 2 and its interaction protein p11 in pregnant sheep myometrium*. J Mol Endocrinol, 2007. **38**(4): p. 441-54.
166. Inoue, T., et al., *Vasopressin regulates apical targeting of aquaporin-2 but not of UT1 urea transporter in renal collecting duct*. Am J Physiol, 1999. **276**(4 Pt 2): p. F559-66.
167. Isacke, C.M., I.S. Trowbridge, and T. Hunter, *Modulation of p36 phosphorylation in human cells: studies using anti-p36 monoclonal antibodies*. Mol Cell Biol, 1986. **6**(7): p. 2745-51.
168. Valenti, G., et al., *A heterotrimeric G protein of the Gi family is required for cAMP-triggered trafficking of aquaporin 2 in kidney epithelial cells*. J Biol Chem, 1998. **273**(35): p. 22627-34.
169. Nielsen, S., J. Muller, and M.A. Knepper, *Vasopressin- and cAMP-induced changes in ultrastructure of isolated perfused inner medullary collecting ducts*. Am J Physiol, 1993. **265**(2 Pt 2): p. F225-38.
170. Leduc-Nadeau, A., et al., *New autosomal recessive mutations in aquaporin-2 causing nephrogenic diabetes insipidus through deficient targeting display normal expression in Xenopus oocytes*. J Physiol, 2010. **588**(Pt 12): p. 2205-18.
171. Huang, B., et al., *Hypoxia-inducible factor-1 drives annexin A2 system-mediated perivascular fibrin clearance in oxygen-induced retinopathy in mice*. Blood, 2011. **118**(10): p. 2918-29.
172. Flood, E.C. and K.A. Hajjar, *The annexin A2 system and vascular homeostasis*. Vascul Pharmacol, 2011. **54**(3-6): p. 59-67.
173. Di Marco, G.S., et al., *High phosphate directly affects endothelial function by downregulating annexin II*. Kidney Int, 2012.
174. Chung, C.Y. and H.P. Erickson, *Cell surface annexin II is a high affinity receptor for the alternatively spliced segment of tenascin-C*. J Cell Biol, 1994. **126**(2): p. 539-48.
175. Hajjar, K.A., A.T. Jacovina, and J. Chacko, *An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II*. J Biol Chem, 1994. **269**(33): p. 21191-7.
176. Domoto, T., et al., *Evaluation of S100A10, annexin II and B-FABP expression as markers for renal cell carcinoma*. Cancer Sci, 2007. **98**(1): p. 77-82.
177. Oudinet, J.P., et al., *Protein kinase C-dependent phosphorylation of annexins I and II in mesangial cells*. Biochem J, 1993. **292** ( Pt 1): p. 63-8.
178. Yung, S., et al., *Anti-dsDNA Antibodies Bind to Mesangial Annexin II in Lupus Nephritis*. Journal of the American Society of Nephrology, 2010. **21**(11): p. 1912-1927.
179. Dihazi, H., et al., *Proteomic analysis of cellular response to osmotic stress in thick ascending limb of Henle's loop (TALH) cells*. Mol Cell Proteomics, 2005. **4**(10): p. 1445-58.

180. van de Graaf, S.F., J.G. Hoenderop, and R.J. Bindels, *Regulation of TRPV5 and TRPV6 by associated proteins*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006. **290**(6): p. F1295-302.
181. Yu, M.J., et al., *Large-scale quantitative LC-MS/MS analysis of detergent-resistant membrane proteins from rat renal collecting duct*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008. **295**(3): p. C661-78.
182. van Balkom, B.W., et al., *Proteomic analysis of long-term vasopressin action in the inner medullary collecting duct of the Brattleboro rat*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004. **286**(2): p. F216-24.
183. Hollas, H., et al., *Annexin A2 recognises a specific region in the 3'-UTR of its cognate messenger RNA*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1763**(11): p. 1325-34.
184. Filipenko, N.R., et al., *Annexin A2 is a novel RNA-binding protein*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(10): p. 8723-31.
185. Aukrust, I., et al., *The mRNA-binding site of annexin A2 resides in helices C-D of its domain IV*. *J Mol Biol*, 2007. **368**(5): p. 1367-78.
186. Kwak, H., M.W. Park, and S. Jeong, *Annexin A2 binds RNA and reduces the frameshifting efficiency of infectious bronchitis virus*. *PLoS One*, 2011. **6**(8): p. e24067.
187. Chabanon, H., et al., *An AU-rich stem-loop structure is a critical feature of the perinuclear localization signal of c-myc mRNA*. *Biochem J*, 2005. **392**(Pt 3): p. 475-83.
188. Mickleburgh, I., et al., *Annexin A2 binds to the localization signal in the 3' untranslated region of c-myc mRNA*. *FEBS J*, 2005. **272**(2): p. 413-21.
189. Hozawa, S., E.J. Holtzman, and D.A. Ausiello, *cAMP motifs regulating transcription in the aquaporin 2 gene*. *Am J Physiol*, 1996. **270**(6 Pt 1): p. C1695-702.
190. Yasui, M., et al., *Adenylate cyclase-coupled vasopressin receptor activates AQP2 promoter via a dual effect on CRE and AP1 elements*. *Am J Physiol*, 1997. **272**(4 Pt 2): p. F443-50.
191. Matsumura, Y., et al., *Transcriptional regulation of aquaporin-2 water channel gene by cAMP*. *J Am Soc Nephrol*, 1997. **8**(6): p. 861-7.
192. Gerke, V., C.E. Creutz, and S.E. Moss, *Annexins: linking Ca<sup>2+</sup> signalling to membrane dynamics*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. **6**(6): p. 449-61.
193. Zwang, N.A., et al., *Identification of phosphorylation-dependent binding partners of aquaporin-2 using protein mass spectrometry*. *J Proteome Res*, 2009. **8**(3): p. 1540-54.
194. Rothhut, B., *Participation of annexins in protein phosphorylation*. *Cell Mol Life Sci*, 1997. **53**(6): p. 522-6.
195. Hebert, R.L., *Cellular signalling of PGE<sub>2</sub> and its selective receptor analogue sulprostone in rabbit cortical collecting duct*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1994. **51**(3): p. 147-55.
196. Jones, P.G., G.J. Moore, and D.M. Waisman, *A nonapeptide to the putative F-actin binding site of annexin-II tetramer inhibits its calcium-dependent activation of actin filament bundling*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(20): p. 13993-7.
197. Gerke, V. and K. Weber, *Identity of p36K phosphorylated upon Rous sarcoma virus transformation with a protein purified from brush borders; calcium-dependent binding to non-erythroid spectrin and F-actin*. *EMBO J*, 1984. **3**(1): p. 227-33.
198. Glenney, J., *Two related but distinct forms of the Mr 36,000 tyrosine kinase substrate (calpactin) that interact with phospholipid and actin in a*

- Ca<sup>2+</sup>-dependent manner*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(12): p. 4258-62.
199. Ikebuchi, N.W. and D.M. Waisman, *Calcium-dependent regulation of actin filament bundling by lipocortin-85*. J Biol Chem, 1990. **265**(6): p. 3392-400.
200. Puisieux, A., J. Ji, and M. Ozturk, *Annexin II up-regulates cellular levels of p11 protein by a post-translational mechanisms*. Biochem J, 1996. **313** (Pt 1): p. 51-5.
201. Bellagamba, C., et al., *Tyrosine phosphorylation of annexin II tetramer is stimulated by membrane binding*. J Biol Chem, 1997. **272**(6): p. 3195-9.
202. Zheng, L., et al., *Tyrosine 23 phosphorylation-dependent cell-surface localization of annexin A2 is required for invasion and metastases of pancreatic cancer*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e19390.
203. Rescher, U., et al., *Tyrosine phosphorylation of annexin A2 regulates Rho-mediated actin rearrangement and cell adhesion*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 13): p. 2177-85.
204. de Graauw, M., et al., *Annexin A2 phosphorylation mediates cell scattering and branching morphogenesis via cofilin Activation*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(3): p. 1029-40.
205. Charest, P.G., et al., *The V2 vasopressin receptor stimulates ERK1/2 activity independently of heterotrimeric G protein signalling*. Cell Signal, 2007. **19**(1): p. 32-41.
206. Oligny-Longpre, G., et al., *Engagement of beta-arrestin by transactivated insulin-like growth factor receptor is needed for V2 vasopressin receptor-stimulated ERK1/2 activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(17): p. E1028-37.
207. Garrido-Gomez, T., et al., *Annexin A2 is critical for embryo adhesiveness to the human endometrium by RhoA activation through F-actin regulation*. FASEB J, 2012. **26**(9): p. 3715-27.
208. Babbin, B.A., et al., *Annexin 2 regulates intestinal epithelial cell spreading and wound closure through Rho-related signaling*. Am J Pathol, 2007. **170**(3): p. 951-66.
209. Castrop, H., et al., *Low tonicity mediates a downregulation of cyclooxygenase-1 expression by furosemide in the rat renal papilla*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(5): p. 1136-44.
210. Yang, T., et al., *MAPK mediation of hypertonicity-stimulated cyclooxygenase-2 expression in renal medullary collecting duct cells*. J Biol Chem, 2000. **275**(30): p. 23281-6.
211. Yang, T., et al., *Regulation of cyclooxygenase expression in the kidney by dietary salt intake*. Am J Physiol, 1998. **274**(3 Pt 2): p. F481-9.
212. Jensen, B.L. and A. Kurtz, *Differential regulation of renal cyclooxygenase mRNA by dietary salt intake*. Kidney Int, 1997. **52**(5): p. 1242-9.
213. Yang, T., J.B. Schnermann, and J.P. Briggs, *Regulation of cyclooxygenase-2 expression in renal medulla by tonicity in vivo and in vitro*. Am J Physiol, 1999. **277**(1 Pt 2): p. F1-9.
214. Cowley, B.D., Jr., et al., *In vivo and in vitro osmotic regulation of HSP-70 and prostaglandin synthase gene expression in kidney cells*. Am J Physiol, 1995. **269**(6 Pt 2): p. F854-62.
215. Breyer, M.D. and R.M. Breyer, *Prostaglandin E receptors and the kidney*. Am J Physiol Renal Physiol, 2000. **279**(1): p. F12-23.
216. Morel, E. and J. Gruenberg, *The p11/S100A10 light chain of annexin A2 is dispensable for annexin A2 association to endosomes and functions in endosomal transport*. PLoS One, 2007. **2**(10): p. e1118.



217. Laviaille, F., et al., *Establishment of plasma membrane polarity in mammary epithelial cells correlates with changes in prolactin trafficking and in annexin VI recruitment to membranes*. *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1464**(1): p. 83-94.
218. de Diego, I., et al., *Cholesterol modulates the membrane binding and intracellular distribution of annexin 6*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(35): p. 32187-94.
219. Podszywalow-Bartnicka, P., et al., *Calcium- and proton-dependent relocation of annexin A6 in Jurkat T cells stimulated for interleukin-2 secretion*. *Acta Biochim Pol*, 2007. **54**(2): p. 261-71.
220. Cubells, L., et al., *Annexin A6-induced alterations in cholesterol transport and caveolin export from the Golgi complex*. *Traffic*, 2007. **8**(11): p. 1568-89.