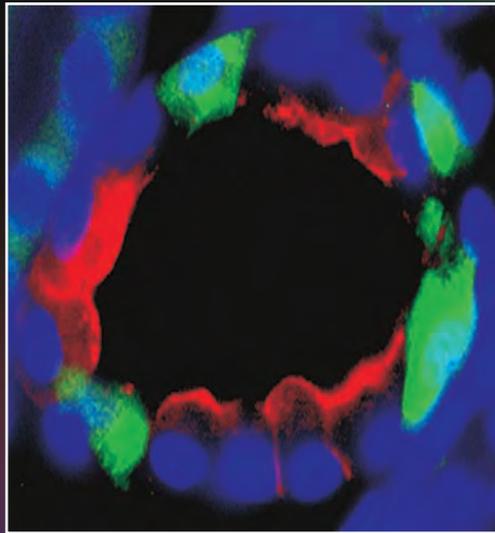


Durch [Arg<sup>8</sup>]Vasotocin induzierte  
Translokation des Wasserkanals Aquaporin-2  
im tubulären System der Hühnerniere

Kerstin Mütze



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut der Veterinärphysiologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger

**Durch [Arg<sup>8</sup>]Vasotocin induzierte  
Translokation des Wasserkanals Aquaporin-2  
im tubulären System der Hühnerniere**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr.med.vet  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Kerstin Mütze**

Tierärztin aus Frechen

Giessen 2011

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Gerstberger

Prof. Dr. Neiger

Tag der Disputation: 19.09.2011

meinem Mann und meinen Eltern gewidmet

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Kapitel: Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1.	Anatomie der Vogelniere	1
1.2.	Funktionelle Histologie und Physiologie der Vogelniere	2
1.2.1.	Feinbau der Niere	2
1.2.2.	Der Markkegel	6
1.2.3.	Funktionelle Histologie und Physiologie des Nephrons	7
1.2.3.1.	Glomerulum und glomeruläre Filtration	7
1.2.3.2.	Juxtaglomerulärer Apparat ( <i>Complexus juxtaglomerularis</i> )	10
1.2.4.	Der Tubulusapparat	12
1.2.4.1.	Proximaler Tubulus	12
1.2.4.2.	Die Markschleife ( <i>Ansa nephroni</i> )	16
1.2.4.3.	Distaler Tubulus	19
1.2.4.4.	Das Verbindungsstück ( <i>Tubulus conjugans</i> )	21
1.2.4.5.	Das Sammelrohrsystem	22
1.2.4.6.	Die Nierenblutgefäße	23
1.2.5.	Harnkonzentrierung beim Vogel	25
1.3.	Hormonale Kontrolle der renalen NaCl- und Wasserresorption beim Vogel	28
1.3.1.	Angiotensin II (AngII) und Aldosteron (ALDO)	28
1.3.2.	B- und C-Typ spezifische natriuretische Peptide	30
1.3.3.	[Arg <sup>8</sup> ]Vasotocin – das antidiuretische Hormon der Vögel	32
1.3.3.1.	Biosynthese, axonaler Transport und geregelte Freisetzung des AVT	34
1.3.3.2.	Renales Wirkungsspektrum des AVT	37
1.3.3.3.	AVT-spezifische Rezeptorproteine	39
1.3.3.3.1.	Die V <sub>1a</sub> - und V <sub>1b</sub> -Rezeptorsubtypen des Säugers	39
1.3.3.3.2.	Der renale V <sub>2</sub> -Rezeptorsubtyp des Säugers; cAMP als <i>second messenger</i>	40
1.3.3.3.3.	AVT-Rezeptoren bei Vögeln	41

## Inhaltsverzeichnis

1.4.	Aquaporine	43
1.4.1.	Klassifizierung der renal exprimierten Aquaporine	44
1.4.2.	Molekulare Struktur des Aquaporin-2 (AQP-2)	48
1.4.3.	Funktion und Bedeutung des AQP-2	50
1.4.4.	AVP-induzierte <i>de novo</i> Synthese und Translokation von AQP-2	51
1.4.5.	Hintergründe und Fragestellung der wissenschaftlichen Arbeit	53
<b>2.</b>	<b>Kapitel: Material und Methoden</b>	<b>57</b>
2.1.	Material	57
2.1.1.	Geräte	57
2.1.2.	Gebrauchsmaterial	58
2.1.3.	Verbrauchsmaterial	59
2.1.4.	Chemikalien	60
2.2.	Methoden	62
2.2.1.	Versuchstiere	62
2.2.2.	Experimentelle Versuchsprotokolle	63
2.2.2.1.	Tierversuche	63
2.2.2.2.	Blut- und Plasmaanalyse	65
2.2.2.3.	Immunhistochemie, Allgemeine Grundlagen	66
2.2.2.4.	Immunhistochemischer Nachweis von Aquaporin-2 (AQP-2), zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und der Carboanhydrase II (CA II) in der Niere	69
2.2.2.4.1.	Verwendete Lösungen für die transkardiale Perfusion	69
2.2.2.4.2.	Narkose und transkardiale Perfusion	70
2.2.2.4.3.	Verwendete Lösungen sowie Vorbereitungen für die Immunhistochemie	72
2.2.2.4.4.	Durchführung der Immunhistochemie	73
2.2.2.4.5.	Negativkontrollen	75
2.2.2.4.6.	(Semi-) quantitative Auswertung der Immunfluoreszenz-Mikroskopie	75
2.2.2.4.7.	Hämatoxylin-Eosin Färbung von Schnitten der Hühnerniere	78

## Inhaltsverzeichnis

2.2.2.5.	Rezeptorbindungsstudien für [ <sup>3</sup> H]AVP in der Niere des Huhnes	78
2.2.2.5.1.	Kinetik der Rezeptor-Liganden Interaktion	78
2.2.2.5.2.	Verwendete Lösungen für den [ <sup>3</sup> H]AVP Radiorezeptorassay	83
2.2.2.5.3.	Präparation zellulärer Plasmamembranen aus der Niere des Huhnes	84
2.2.2.5.4.	Durchführung des [ <sup>3</sup> H]AVP RRA für die Niere des Huhnes	85
2.2.2.5.5.	Proteinbestimmung	88
2.2.2.5.6.	Auswertung	88
2.2.2.5.7.	Rezeptorautoradiographie für [ <sup>3</sup> H]AVP in der Niere des Huhnes	89
<b>3.</b>	<b>Kapitel: Ergebnisse</b>	<b>92</b>
3.1.	Histomorphologie der Hühnerniere : HE-Färbung	92
3.2.	Immunhistochemischer Nachweis für AQP-2 und CA-II in der Hühnerniere	101
3.2.1.	Aquaporin-2 (AQP-2) Expression in der Hühnerniere	101
3.2.2.	Spezifität des gegen AQP-2 gerichteten, polyclonalen Primärantiserums	104
3.2.3.	Identifikation AQP-2 exprimierender, tubulärer Strukturen der Hühnerniere	106
3.2.4.	Renale Carboanhydrase II (CA-II) Expression	111
3.3.	Die AVT-induzierte zelluläre Translokation des Wasserkanals AQP-2 in Sammelrohrzellen der Hühnerniere	113
3.3.1.	Charakterisierung osmo- und volumenregulatorisch relevanter Blut- bzw. Plasmaparameter sowie der Plasmakonzentration an AVT	113
3.3.2.	Auswertung der Translokation des Aquaporins	115
3.4.	AVT-induzierte Bildung von cAMP in der Hühnerniere	125
3.5.	Charakterisierung des renalen AVT-rezeptiven Systems in der Hühnerniere	130
3.5.1.	AVT induzierte „Down“- Regulation des renalen AVT-spezifischen Rezeptors	130
3.5.2.	Charakterisierung des AVT-Rezeptor Subtyps in der Hühnerniere durch kompetitive Verdrängungsstudien	135
3.5.3.	Autoradiographische Darstellung der spezifischen renalen [ <sup>3</sup> H]AVP Bindung	137
<b>4.</b>	<b>Kapitel: Diskussion</b>	<b>139</b>
4.1.	Regulation der aviären AVT-Freisetzung	139

## Inhaltsverzeichnis

4.2.	Renale Wirkungen des AVT bei Vögeln	144
4.2.1.	AVT-Wirkung auf die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) der Vogelniere	145
4.2.2.	Wirkungen des AVT auf das Tubulussystem	147
4.2.3.	Nephrogener Diabetes insipidus beim Vogel	149
4.2.4.	Vergleichende renale AVT-Wirkung bei Fischen, Amphibien und Reptilien	150
4.3.	Das AVT-rezeptive System der Vogelniere	152
4.4.	cAMP als <i>second messenger</i> für die renale Wirkung des AVT	156
4.5.	Charakteristika, Lokalisation und Regulation des renalen AQP-2 Wasserkanals im Vergleich zwischen Säugern und Vögeln	160
4.6.	Die Translokation des AQP-2 Wasserkanals in die apikale bzw. laterale Plasmamembran der Sammelrohrzellen	165
4.6.1.	Die Bedeutung der PKA, der PKA-Ankerproteine, des Calciums sowie der Phosphorylierung im Rahmen der AVP-induzierten AQP-2 Translokation	168
4.6.2.	Die Bedeutung des Zytoskeletts und SNARE- Komplexes im Rahmen der AVP- induzierten AQP-2 Translokation	171
4.6.3.	Translokation des AQP-2 Wasserkanals in die basolaterale Zellmembran	174
<b>5.</b>	<b>Kapitel: Zusammenfassung</b>	<b>177</b>
<b>6.</b>	<b>Kapitel: Literaturverzeichnis</b>	<b>183</b>
<b>7.</b>	<b>Kapitel: Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>222</b>
<b>8.</b>	<b>Kapitel: Anhang</b>	<b>228</b>
8.1.	Publikationen	228
8.1.1.	Wissenschaftliche Veröffentlichungen	228
8.1.2.	Veröffentlichte Abstrakte	228
8.1.3.	Nichtveröffentlichte Abstrakte	228
8.2.	Danksagung	229
8.3.	Erklärung	230



# 1. KAPITEL

## Einleitung

Die Niere ist maßgeblich an physiologischen Prozessen (1) zur Eliminierung von Stoffwechselprodukten, (2) zur Regulation des Säure-Basenhaushalts oder (3) im Rahmen der Homöostase des Flüssigkeits- und Elektrolythaushalts beteiligt. Letztere wird als die Fähigkeit von Lebewesen definiert, im Extrazellulärraum ihrer Gewebe sowie dem Blutplasma die Konstanz des osmotischen Drucks sowie des Volumens durch physikalische und hormonell gesteuerte Kontrollmechanismen aufrechtzuerhalten. Der efferente Aspekt der Osmoregulation beim Vogel wird durch die geregelte Aktivierung/Hemmung mehrerer Effektorsysteme einschließlich des Darmtrakts, der Haut und des Atmungstraktes, vor allem aber der supraorbitalen Salzdrüsen (marine Spezies) und der Nieren bestimmt, welche beim Vogel wie beim Säuger das primäre Zielorgan der Körperflüssigkeitshomöostase darstellen [Goldstein und Skadhauge, 2000].

### 1.1. Anatomie der Vogelniere

Die Harnorgane des Vogels bestehen aus den paarig angelegten Nieren (*Renes*) und deren abführenden Harnleitern (*Ureteres*). Im Gegensatz zur Anatomie des Urogenitaltraktes bei Säugetieren fehlt die Harnblase, und die Harnröhre ist aufgrund der vorhandenen Kloake nicht ausgebildet [Waibl und Sinowatz, 1992; Salomon, 1993]; Nierenbecken und -papillen fehlen ebenfalls [Zwingmann, 1973]. Die anatomische Lage der Vogelnieren wird durch entsprechende Einbuchtungen des *Synsacrum* und des *Os ilium* bestimmt und die Nieren sind von Divertikeln des Bauchluftsackes umgeben. Die Ventralflächen der Vogelnieren werden bei weiblichen Tieren nach cranial vom Keimdrüsengewebe und nach caudal von Abschnitten des Darmes und des Eileiters abgegrenzt. Ventral befindet sich das *Peritoneum* des Eingeweidebauchfellsackes und an der linken Niere ein Teil des Eileitergekröses. Die demzufolge retroperitoneal liegende Vogelniere lässt sich in drei Kompartimente gliedern (*Divisiones renalis cranialis*, *medialis* und *caudalis*), welche über Parenchymbrücken miteinander verbunden sind [Waibl und Sinowatz, 1992]. Die anatomische Unterteilung der *Divisiones renalis cranialis* und *medialis* basiert auf dem Verlauf der A. und V. *iliaca*, welche die beiden Kompartimente voneinander trennen. Im Gegensatz dazu unterteilen die A. und V. *ischiadica* die *Divisiones renalis medialis* und *caudalis*.

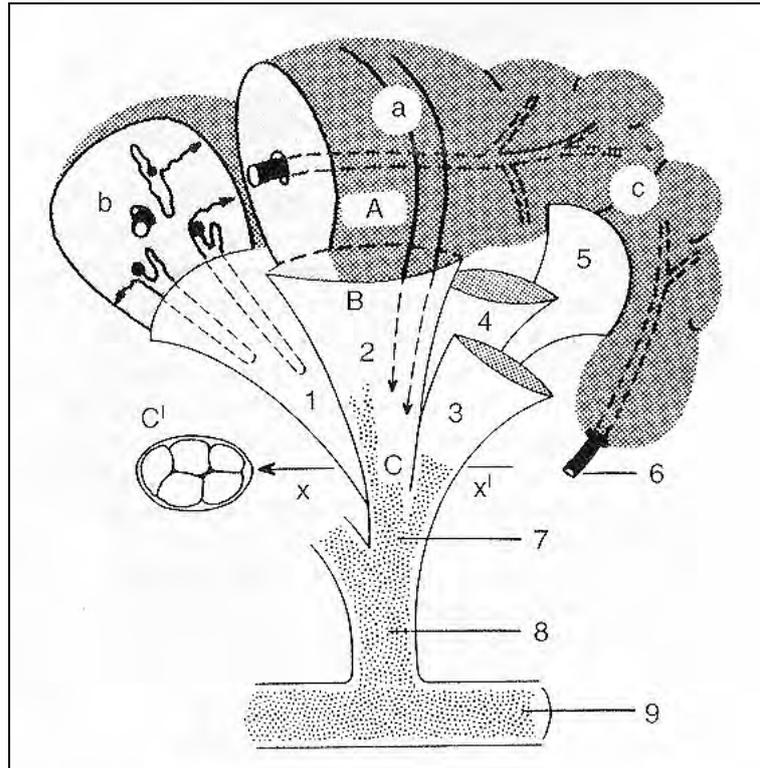
Zusätzlich zum Verlauf der oben genannten Blutgefäße treten besonders im Bereich des mittleren und caudalen Kompartiments mehrere Äste des *Plexus sacralis* durch das Nierengewebe hindurch [Salomon, 1993]. Die Größe der Hühnerniere liegt bei ca. (7 - 10) x 2 x 1,5 cm und das Gewicht beider Nieren beträgt 0,8 % des Körpergewichtes bei Vögeln ohne und 1,4 % bei Vögeln mit supraorbitalen Salzdrüsen [Hughes, 1970]. Gregg und Wideman Jr [1990] verzeichneten bei adulten Hühnern ein Gesamtgewicht der linken und rechten Niere von  $14,3 \pm 0,7$  g.

### **1.2. Funktionelle Histologie und Physiologie der Vogelniere**

#### ***1.2.1 Feinbau der Niere***

Aus histologischer Sicht lässt sich die Niere des Vogels im Allgemeinen und des Huhnes (*Gallus gallus domesticus*) im Besonderen in zahlreiche Lappen (*Lobus renalis*) und diese wiederum in Läppchen (*Lobulus renalis*) unterteilen (Abb. 1), wobei beide Struktureinheiten eine dreidimensional pilzförmige Gestalt aufweisen. Die umhüllende Nierenkapsel entlässt dünne Septen in die Tiefe, welche die einzelnen *Lobuli renales* begrenzen. *Per definitionem* besteht ein Läppchen aus einer Markzone (*Medulla renalis*) und aus der jeweils sie versorgenden corticalen Region (*Cortex renalis*) (Abb. 1) [Siller, 1983]. Die kleinste funktionelle Einheit der Vogelniere ist das Nephron, das aus dem Nierenkörperchen (*Corpusculum renis*) und dem anschließenden Tubulusapparat besteht (Abb. 2) [Waibl und Sinowatz, 1992]. Die paarigen Nieren des Huhnes weisen jeweils 220.000 - 450.000 Nephrone auf [Cowen *et al.*, 1987]. Ausgehend von den corticalen Einheiten lassen sich Nephrone in ihrem tubulären Verlauf zu medullären Untereinheiten verschiedener *Lobuli* verfolgen; umgekehrt münden in jede medulläre Untereinheit Nephrone aus verschiedenen corticalen Einheiten [Johnson *et al.*, 1972].

Morphologisch unterscheidet man Nephrone vom reptilienähnlichen, corticalen Typ (reptilian-type-Nephron = RT, loopless-Nephron = LLN) von solchen des säugetierähnlichen, medullären Typs (mammalian-type-Nephron = MT, looped-Nephron = LN) (Abb. 2). Die corticalen Nephrone des Huhnes sind zahlreicher (ca. 60 - 90 % der Nephrone) [Dantzer und Braun, 1980] und weisen eine mittlere Länge von etwa 6,5 mm auf, wobei nahe der Nierenoberfläche befindliche corticale Nephrone verhältnismäßig kurz (2 mm) sind.

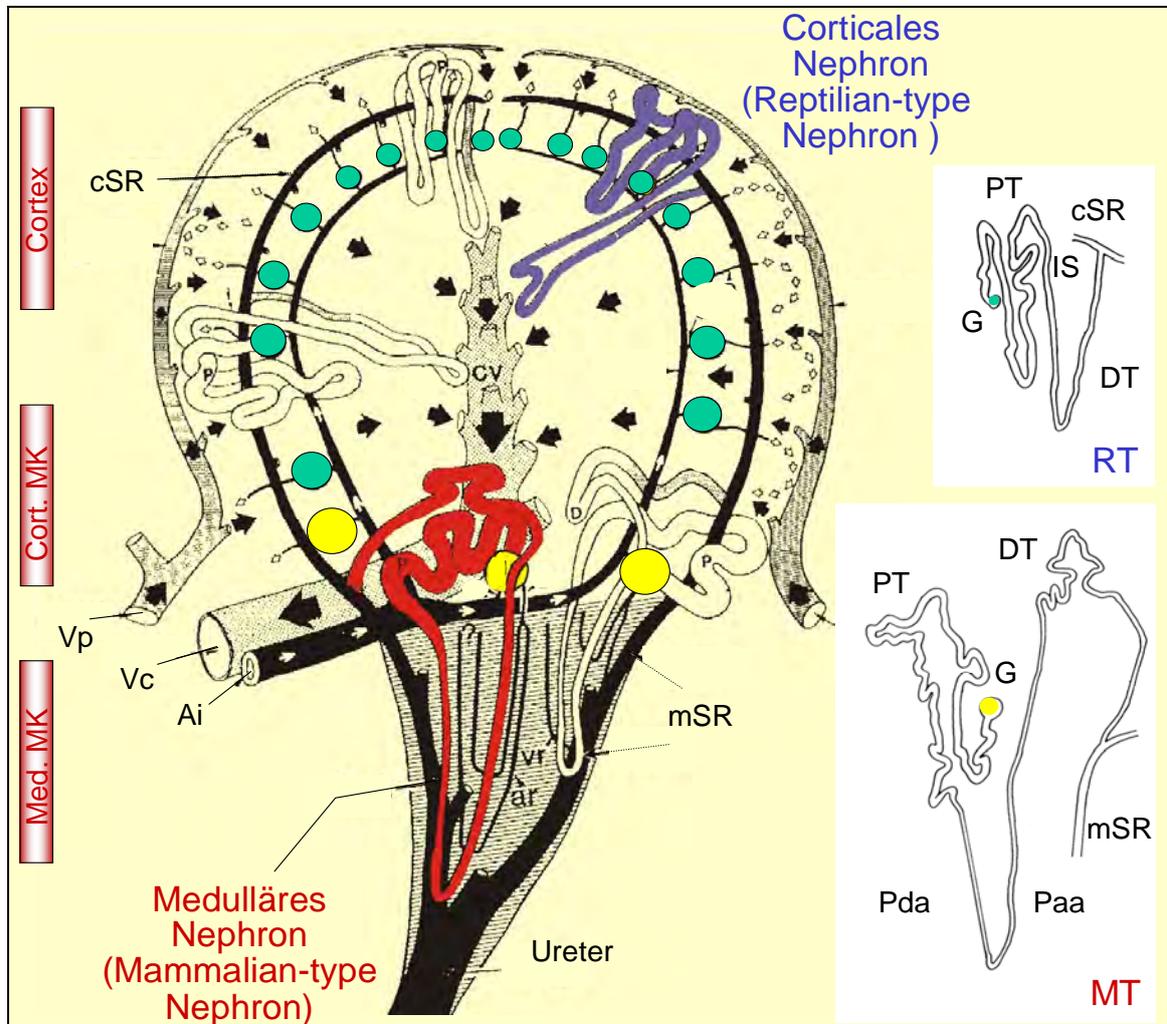


**Abb. 1 :** Schematische Darstellung eines *Lobus renalis* (Nierenlappen) mit fünf *Lobuli renales* (Nierenläppchen, 1-5) der Vogelnieren.

**A** Cortex renalis und **B** Medulla renalis des *Lobulus renalis* Nr. 2, **C** Medulla renalis eines *Lobus renalis* bestehend aus den *Lobuli* 1-5. **C'**, **x** und **x'** repräsentieren einen Querschnitt durch die Medulla renalis des *Lobus renalis*. **a** Cortex renalis des *Lobulus renalis* 2, **b** Cortex renalis des *Lobulus renalis* 1, **c** Grenze zwischen zwei Cortexzonen. **6** Vena intralobularis, **7** Ramus uretericus secundarius, **8** Ramus uretericus primarius, **9** Ureter (nach King und McLelland, 1978).

Corticale Nephronen setzen sich laut Huber [1917] aus proximalen Tubulus (3,5 mm), intermediärem Segment, distalem Tubulus sowie Sammelrohr zusammen, welches in den corticalen Markkegel mündet. Sie weisen typischerweise keine oder nur eine gering ausgebildete Henlesche Schleife auf, welche - sofern vorhanden - stets vollständig innerhalb der Rindenzone gelegen ist. Die medullären Nephronen der Hühnerei (ca. 10 - 40 % aller Nephronen) sind im Vergleich zu den corticalen Nephronen länger (15 - 16 mm) und liegen in den markkegelnahen Anteilen der Nierenläppchen. Sie weisen einen proximalen Tubulus (8,5 mm), eine in den Markkegel ziehende Henlesche Schleife, einen distalen Tubulus (2,2 mm) und ein Sammelrohr (1,2 mm) auf, wobei letzteres in den medullären Markkegel mündet [Wideman, 1988]. Bei einigen Vogelarten, u.a. dem Haushuhn, wurde noch ein dritter Nephrontyp beschrieben. Dieser weist sowohl medulläre

als auch corticale Charakteristika auf, ist ca. 13 mm lang und besitzt im Vergleich zum medullären Typ eine kürzere Henlesche Schleife sowie ein verlängertes intermediäres Segment [Huber, 1917; Boykin und Braun, 1993].



**Abb. 2 :** Schematische Darstellung eines Lobulus renalis.

In jedem Lobulus renalis (Nierenläppchen) wird die arterielle Blutzufuhr über die A. intralobularis (Ai), sowie zusätzlich eine venöse Blutzufuhr über die afferente Vena portalis renalis (Vp) gewährleistet. Der venöse Abfluss des Blutes erfolgt über die zentral verlaufende V. intralobularis (=Zentralvene, Vc). Die medullären Nephrene, (mammalian-type Nephrene, **MT-Nephrene**) reichen mit ihrer Henleschen Schleife (Pars descendens ansae (Pda) und Pars ascendens ansae (Paa) in den medullären Markkegel (Med. MK), wo sie in die medullären Sammelrohre (mSR) fließen. Die corticalen Nephrene (reptilian-type-Nephrene, **RT-Nephrene**), welche keine Henleschen Schleifen besitzen, treten in die corticale Sammelrohre (cSR) entweder im Bereich des Cortex renalis oder des corticalen Markkegels (Cort. MK) ein. G= Glomerulum, IS= intermediäres Segment, PT= Proximaler Tubulus, DT= Distaler Tubulus. Abbildung modifiziert nach Wideman [1988].

In der Circumferenz eines Nierenläppchens verlaufen die *Vv. interlobulares* des vogel-spezifischen Nierenportadersystems sowie perilobuläre Sammelrohre. Im Zentrum des *Lobulus* verläuft die abführende zentrale Läppchenvene (*V. intralobularis*). In der Peripherie verläuft die den *Lobus* versorgende *A. intralobaris* zirkulär um die *V. intralobularis* und verzweigt sich in die *Aa. intralobulares*, von welcher die *Vasa afferentia* ihren Ursprung nehmen, die ihrerseits die MT- und die RT-Nephrene versorgen (Abb. 2). Innerhalb der corticalen Zone eines *Lobulus renalis* sind die kleinen RT-Glomerula nahezu hufeisenförmig um die zentrale *V. intralobularis*, in der Region zwischen der *A. intralobularis* und den corticalen Sammelrohren, angeordnet [Dantzler und Braun, 1980]. Die zugehörigen tubulären Segmente der RT-Nephrene erstrecken sich zwischen der *V. interlobularis* als terminalem Ast der renalen Portalvene und der jeweiligen *V. intralobularis* eines Nierenläppchens. Der *Tubulus distalis* (DT) eines RT-Nephrons mündet im rechten Winkel in das jeweilige corticale Sammelrohr eines *Lobulus* [Johnson, 1979; Morild *et al.*, 1985a] (Abb. 2). Die MT-Glomerula sind auf Höhe des Übergangs vom *Cortex* zur *Medulla renalis* (paramedullär) eines Nierenläppchens angeordnet (Abb. 2). Korrosionspräparate der MT-Glomerula zeigen, dass deren Größe zur Peripherie hin schrittweise abnimmt [Kurihara und Yasuda, 1975b]. Die aus den Nierenkörperchen hervortretenden proximalen Tubuli sind vorwiegend in der Läppchenperipherie anzutreffen, wohingegen die distalen Abschnitte des Nephrons überwiegend in Nähe zur *V. intralobularis* lokalisiert sind (Abb. 2). Die peripher um das Läppchen ziehenden Harnsammelrohre vereinigen sich und bilden im Bereich des medullären Markkegels ein konisches Bündel [Johnson, 1974]. Dieser Gewebebezirk des „Pilzstiels“ eines *Lobulus* stellt die Markzone (*Medulla renalis*, Markkegel) des Läppchens dar und enthält neben den Sammelrohren die Henleschen Schleifen (HSs) marknaher MT-Nephrene sowie die *Vasa recta* (Abb. 2). Aufgrund des Vorhandenseins einer langen HS sind die MT-Nephrene in der Lage, einen im Vergleich zum Blutplasma konzentrierten Endharn zu produzieren (Kap. 1.2.5). Die prozentualen Anteile der einzelnen strukturellen Komponenten der Hühnerniere ergeben sich wie folgt zu: 80 % *Cortex renalis*, 8 - 9 % *Medulla renalis*, 1 % Ureter, 5 % afferente Venen (renale Portalvenen), 5 % efferente Venen (renale Venen) und 1 - 2 % Arterien und Arteriolen. Der corticale Bereich wird prozentual in folgende Anteile unterteilt: 46 % proximaler Tubulus, 15 % distaler Tubulus, 9 % peritubuläre Kapillaren, 4 % RT-Glomerula, 1 % MT-

Glomerula, 4 % Verbindungsstücke und 2 % corticale Sammelrohre [Warui und King, 1985].

### ***1.2.2. Der Markkegel***

Der Markkegel (MK) stellt den verjüngten Teil eines pilzförmigen *Lobulus renalis* dar (Abb. 2) und lässt sich in zwei histologisch unterscheidbare Bereiche unterteilen, den corticalen MK und den medullären MK. Als corticaler MK wird die Übergangszone des medullären MK zum *Cortex renalis* bezeichnet. Als charakteristisch für den corticalen MK sind die im Randgebiet positionierten corticalen Sammelrohre sowie die Glomerula und hochprismatischen Epithelien der proximalen Tubuli der MT-Nephronen anzusehen, welche sich im weiteren Verlauf verjüngen, um in den dünnen absteigenden Ast der HS überzugehen [Johnson, 1979]. Diese HS durchdringt den medullären MK auf verschiedenen Ebenen und wird in einen dünnen absteigenden und einen dicken aufsteigenden Abschnitt unterteilt, wobei letzterer schon vor der Wendung der Schleife beginnt [Johnson und Mugaas, 1970; Ridderstrale, 1980; Nishimura *et al.*, 1986] und letztlich zum vaskulären Pol des „elterlichen“ Glomerulum aufsteigt [Huber, 1917; Siller und Wright, 1976]. Der nachfolgende distale Tubulus geht in das Verbindungsstück über, welches in ein medulläres bzw. im Bereich des corticalen MKs in ein corticales Sammelrohr übergeht. Mehrere corticale Sammelrohre vereinigen sich am Übergang vom *Cortex renalis* in die Basis des MKs [Siller und Hindle, 1969; Johnson und Mugaas, 1970; Kurihara und Yasuda, 1975a] und formen einen einzigen langen Ureterast, welcher den MK an der Spitze beendet (Abb. 2). Sowohl Größe als auch Komplexität des MKs nehmen in Richtung dessen Spitze ab, sobald die HS auf verschiedenen Ebenen innerhalb des Markkegels wendet und die medullären Sammelrohre sich zusammenfügen [Poulson, 1965]. Jeder Markkegel ist von benachbarten *Lobuli* durch eine Bindegewebsschicht isoliert, die fortlaufend den Ureter umgibt. Der Durchmesser des Markkegels beträgt bei den meisten Vogelarten in seinem cortexnahen Bereich 0,2 - 0,5 mm [Johnson, 1979], wobei ca. 20 Sammelrohre in einem Kegel verlaufen [Siller, 1971]. Die Organisation der Markkegel weist bei den einzelnen Vogelarten Unterschiede auf, wobei sich generell zwei Formen aufzeigen lassen [Johnson und Mugaas, 1970]: Bei *Psittaciformes* (Papageien) und *Piciformes* (Spechte) liegt eine auffällige ringförmige Anordnung der Sammelrohre vor, wohingegen bei den *Galliformes* (Hühnervögel) diese besondere Anordnung des Tubulusapparates fehlt und die Sammel-

rohre zumeist verstreut im Markkegel vorliegen. Die Anzahl der Markinseln pro Volumeneinheit ist abhängig von der Kapazität der Vogelniere zur Wasserretention. So haben die Nieren von Vogelarten mit hoher Kapazität zur Wasserretention deutlich mehr Markinseln, die Harn aus relativ kleinen Rindenbezirken beziehen. Dies hat zur Folge, dass der Anteil von Nephronen des medullären Typs bei diesen Spezies sehr hoch ist und die HSs gut ausgebildet sind, um den Harn nach dem Gegenstromprinzip (Kap. 1.2.5) konzentrieren zu können [Waibl und Sinowatz, 1992].

### ***1.2.3 Funktionelle Histologie und Physiologie des Nephrons***

#### ***1.2.3.1. Glomerulum und glomeruläre Filtration***

In der Vogelniere existieren, den beiden Nephrontypen entsprechend, zwei strukturell unterschiedliche Glomerula, die RT- und die MT-Glomerula. Die im oberen, subkapsulären Bereich des *Cortex renalis* hufeisenförmig um die *V. intralobularis*, in tieferen corticalen Schichten vereinzelt zwischen tubulären Segmenten und den MT-Glomerula angeordneten kleinen RT-Glomerula (50 - 75 µm Durchmesser) zeichnen sich durch einen einfachen strukturellen Aufbau aus [Sperber, 1948; Dantzer und Braun, 1980]. Ausgehend von den *Aa. interlobulares* treten die kurzen *Vasa afferentia* in die jeweiligen RT-Glomerula ein. Dabei penetriert die Arteriole die mesangiale Zellmasse (MZM) des jeweiligen Glomerulum komplett und geht in eine, gegebenenfalls auch zwei, leicht gewundene Kapillaren ohne Anastomosierung über [Morild *et al.*, 1985b; Wideman, 1988]. Bei 5 % der RT-Nephrene verläuft die *Vas afferens* dabei zentral, bei 40 % in der Peripherie der MZM und kapillarisiert am vaskulären Pol des Glomerulum, teilweise schon bevor sie in die MZM eintritt. Die das Glomerulum verlassende *Vas efferens* verläuft entweder parallel zum distalen Tubuls (DT) oder teilt sich schon früh in peritubuläre Kapillaren [Morild *et al.*, 1985b]. Zwischen den intraglomerulären Mesangialzellen und den außerhalb des Glomerulum im Bereich der Kontaktstelle zwischen DT und vaskulären Pol (= *Macula densa*) gelegenen Goormaghtight-Zellen (Go-Zellen) besteht eine deutliche Kontinuität.

Die MT-Glomerula sind in Nähe der corticalen MK lokalisiert. Sie sind wesentlich größer (bis zu 130 µm im Durchmesser) und weisen bei hoher Variabilität eine komplexere Struktur auf. Bei ausgeprägter MZM liegt die afferente Arteriole stets in deren Mitte und wird von Mesangialzellen umgeben. Die efferente Arteriole hingegen wurde nur vereinzelt

innerhalb der MZM vorgefunden [Morild *et al.*, 1985b]. Die Arteriolen verzweigen sich innerhalb bzw. in Nähe der MZM. Im Gegensatz zu den RT-Glomerula weisen die MT-Glomerula mindestens zwei glomeruläre Kapillaren mit ausgedehnter Anastomosierung auf [Wideman, 1988].

Wie bei der Säugerniere besteht das glomeruläre Filter aus (1) einem fenestriertem kapillären Endothel, (2) der kapillären Basalmembran und (3) den Podozytenfüßchen mit Schlitzmembran [Pak Poy und Robertson, 1957; Siller, 1971]. Casotti und Braun (1996) untersuchten die Glycocalix sowie die epitheliale und endotheliale Porengröße des glomerulären Filtrationsweges für die Niere des Huhnes. Die Ergebnisse zeigen eine dicke, negativ geladene Glycocalix, welche die Podocyten, das Schlitzdiaphragma und das Endothel umgibt. Die Poren des Endothels sind elliptisch und liegen in einer Größenordnung von 148 x 110 nm vor. Im Gegensatz dazu weist die Säugerniere kleinere (50 - 100 nm im Durchmesser) und runde Poren des Endothels auf. Die Poren der Schlitzmembran der Filtrationsbarriere sind mit 35 nm im Durchmesser etwa 5 - 7 mal größer als diejenigen der Säugerniere [Casotti und Braun, 1996]. Diese Ergebnisse deuten an, dass die aviären Glomerula offensichtlich die Filtration größerer Moleküle aus dem Plasma erlauben. Die Filtration des Plasmas durch die glomerulären Kapillaren ist der erste Schritt der Bildung des Vogelurins. Aufgrund einer nahezu 50 % Beteiligung des renalen Pfortadersystems an der Gesamtdurchblutung der Hühnerniere erlaubte es erst der Einsatz der Ultraschall-Doppler Flussmessung, die arterielle und portale Nierendurchblutung sowie parallel dazu die glomeruläre Filtrationsrate zu ermitteln [Roberts *et al.*, 1999]. Die Filtrationsfraktion (FF) errechnete sich zu 20 - 22 % in Bezug auf die arterielle Versorgung. Gemäß der Starling-Gleichung bestimmt der intrakapilläre, hydrostatische Druck (abzüglich des onkotischen Drucks im Plasma und des hydrostatischen Drucks in der Bowman-Kapsel) im Wesentlichen den effektiven Filtrationsdruck. Die Filtrationsfraktion kann dabei durch unabhängige hormonale bzw. vegetative Änderung des prä- und/oder postglomerulären Widerstands variiert werden. Durch tubuloglomeruläre Rückkopplung wird zudem die GFR des einzelnen Nephrons an seine Fähigkeit, NaCl zu resorbieren, angepasst (Kap. 1.2.3.2). Die Filtrationsrate eines einzelnen Nephrons (SN-GFR) der Vogelniere ist im Vergleich zur SN-GFR der Säugerniere aufgrund der geringen Filteroberfläche und des strukturell einfachen Baus reduziert. Lediglich aufgrund der höheren Anzahl aviärer

Glomerula verhalten sich die auf die Körpermasse (KM) bezogenen GFR-Werte der gesamten Niere bei Säugern und Vögeln ähnlich [Yokota *et al.*, 1985]. Bei euhydrierten Vögeln korreliert die Gesamt-GFR [ml/h] mit der Körpermasse KM [g] gemäß:  $GFR = 1,24 \times KM^{0,69}$ , wodurch sich für einen Vogel von 1000 g Körpergewicht eine GFR von 145 ml/h errechnet. Bei ausgeprägter Speziesspezifität [Braun und Dantzler, 1972] weisen weibliche Tiere - wie etwa bei den Entenvögeln (*Anatidae*)- eine höhere GFR als männliche auf [Hughes *et al.*, 1989].

Solange sich der arterielle Perfusionsdruck in einem Bereich von 75 - 180 mmHg bei Säugetieren oder 60 - 110 mmHg bei Vögeln befindet, bleibt die Gesamt-GFR relativ konstant [Navar, 1978; Wideman und Gregg, 1988]. Dieses Phänomen, bekannt als die Autoregulation der GFR, schließt zwei Hauptmechanismen ein [Vena *et al.*, 1990]. Ein intrinsisch myogener Mechanismus, der den präglomerulären Widerstand reguliert, verhindert große Änderungen im Nettofiltrationsdruck wie auch arteriellen Perfusionsdruck. Einige Studien vermuten, dass der myogene Mechanismus hauptsächlich für die Autoregulation der GFR der gesamten Niere bei Säugetieren verantwortlich ist [Aukland und Oien, 1987]. Ein zweiter Mechanismus, bekannt als „tubuloglomeruläre Rückkopplung“, erfolgt über den Juxtaglomerulären Apparat (JGA) und könnte die Autoregulation der GFR der gesamten Niere beeinflussen [Moore *et al.*, 1979] (Kap. 1.2.3.2). Diese tubuloglomeruläre Rückkopplung trägt allerdings nicht wesentlich zur Autoregulation der GFR des Huhnes bei. So wird die Autoregulation etwa durch diätetische Natriumzufuhr und damit erhöhte tubuläre Natriumkonzentration nicht wesentlich beeinflusst [Vena *et al.*, 1990]. Eine markante Reduktion der GFR jedoch ist ein konstanter Bestandteil der Vogel- und Reptilien-spezifischen Reaktion auf extrazelluläre Dehydratation und damit einhergehende Erhöhung der Konzentration an zirkulierendem antidiuretischen Hormon [Arg<sup>8</sup>]Vasotocin (= AVT) [Ames *et al.*, 1971; Gerstberger *et al.*, 1985] (Kap. 1.3.3.2). Die verminderte GFR wird durch eine AVT-induzierte Konstriktion der afferenten Arteriolen bedingt, die zu einer Reduktion oder kompletten Einstellung der Filtration in einigen oder allen LLNs führt [Braun und Dantzler, 1974].

### ***1.2.3.2. Juxtaglomerulärer Apparat (Complexus juxtaglomerularis)***

Die Vogelniere weist wie die Säugetiere einen juxtaglomerulären Apparat (JGA) auf, der sich während der Ontogenese im Metanephros des Hühnerembryos entwickelt und aus (1) der *Macula densa* (MD), (2) granulären, epitheloiden Zellen der afferenten (und z.T. efferenten) Arteriole und (3) den extraglomerulären Mesangiumzellen besteht [Narbaitz und Kacew, 1978]. Bei der *Macula densa* handelt es sich um eine Epithelzellplatte im Bereich der Kontaktstelle von distalem Tubulus (DT) und dem Gefäßpol des Nierenkörperchens. Beim Huhn misst diese Epithelzellplatte 20 - 25 µm in der Breite und 30 - 50 µm in der Länge [Wideman, 1988]. MD-Zellen sind charakteristischerweise ausgesprochen hochprismatisch und liegen nahe beieinander, so dass ihre basal lokalisierten Zellkerne komprimiert erscheinen [Edwards, 1940; Morild *et al.*, 1985b]. Signifikante Unterschiede in der Zellstruktur und -aggregation der *Macula densa* zwischen MT- und RT-Nephronen wurden nicht festgestellt.

Die granulären Zellen sind von epitheloidem Aussehen und ontogenetisch erstmalig in noch teilweise undifferenzierten, funktionslosen Glomerula nachzuweisen [Narbaitz und Kacew, 1978]. Das Vorkommen der granulären Zellen variiert zwischen den JGAs der MT- und RT-Nephronen. Bei den meisten Nephronen fanden sowohl Morild *et al.*, [1985b], als auch Ogawa und Sokabe [1971] lediglich im intraglomerulären Teil der afferenten Arteriole wenige granulär-epitheloide Zellen (GEZs). Im Bereich anderer Komponenten des JGA sowie den efferenten Arteriolen des MT-Glomerulum konnten keine GEZs nachgewiesen werden. Nach systemischer Applikation des Natriuretikum/Diuretikum Furosemid konnten auf der gesamten Länge der afferenten Arteriole des RT-Glomerulum, und bei etwa 10 % der RT-JGAs auch der efferenten Arteriole GEZs aufgrund der aufgetretenen Hyperplasie und Hypergranulation histologisch verifiziert werden [Morild *et al.*, 1987]. Andere Autoren beschreiben das Vorkommen granulär-epitheloider Zellen auch vereinzelt im Bereich des *Mesangium* [Kon *et al.*, 1984]. GEZs des Huhnes sind weniger zahlreich und enthalten weniger Granula im Vergleich zu vergleichbaren Zellen der Säugetiere [Taylor *et al.*, 1976].

Neben dem Vorherrschen kontraktiler Elemente stellen die Synthese und granuläre Speicherung der Aspartat-Protease Renin die wichtigste Funktion der GEZs dar [Schaffen-

burg *et al.*, 1960; Sokabe, 1974; Wilson, 1984, Morild *et al.*, 1988] (Kap. 1.3.1). Granuläre Zellen und Reninaktivität wurden für die Nieren verschiedener Vogelspezies beschrieben [Wilson, 1984]. Die Regulation des RAS wird dadurch belegt, dass die Granularität der GEZs signifikant steigt, wenn Hühner mit natriumarmer Diät gefüttert werden. Die Reninsynthese und -sekretion, d.h. die Plasma-Renin-Aktivität nimmt als Antwort auf Natriumentzug, Blutverlust und nachhaltige Hypotension zu [Chan und Holmes 1971; Taylor *et al.*, 1976, Nishimura und Bailey, 1982].

Das extraglomeruläre Mesangium („Polkissen“) entspricht den Goormaghtigh-Zellen oder Lacis-Zellen der Säugetiere [Morild *et al.*, 1985b]. Obwohl histologisch in der Vogelniere schwierig zu identifizieren, wird seine Präsenz für Haushuhn und Wachtel bestätigt [Christensen *et al.*, 1982]. Edwards (1940) konnte das extraglomeruläre Mesangium in zwei Prozent der untersuchten Glomerula nachweisen, während Christensen und Mitarbeiter [1982] stets das mit der zentralen MZM in Verbindung stehende extraglomeruläre Mesangium beschreiben. Dabei füllt das höchstens zweischichtige Mesangium teilweise den Raum zwischen Glomerulum, den afferenten und efferenten Arteriolen und der MD aus [Edwards, 1940; Johnson, 1979; Kon *et al.*, 1984; Morild *et al.*, 1985b]. Die länglichen Zellkerne liegen mit ihrer Längsachse parallel zur Basalmembran der MD-Zellen und bilden so ein Kissen zwischen MD und Mesangium [Christensen *et al.*, 1982]. Alle Komponenten des JGAs (MD, granuläre epitheloide Zellen und extraglomeruläres Mesangium) konnten in beiden Nephrontypen auf allen corticalen Ebenen nachgewiesen werden (granuläre epitheloide Zellen im RT-JGA erst nach Furosemidinjektion) [Morild *et al.*, 1985b].

Den MD-Zellen wird eine Signalübertragungsfunktion zwischen der NaCl-Konzentration der Tubulusflüssigkeit im Bereich des DT einerseits, und der *Vas afferens* sowie den Renin-bildenden, granulären Epitheloidzellen andererseits zugeordnet [Sokabe, 1974; Yokota *et al.*, 1985]. So führt eine Zunahme der NaCl-Konzentration des DT auf Höhe der MD zu einer verstärkten Kontraktion der *Vas afferens* (tubuloglomeruläre Rückkopplung) und einer Hemmung der Reninsekretion. Entsprechend senden die MD-Zellen ein vaso-konstriktorisches Signal an die *Vas afferens*, das zu einer Senkung des hydrostatischen Drucks in den Glomerulumkapillaren und damit einer Reduktion der SNGFR führt.

Letztlich gelangt nun durch erleichterte proximal-tubuläre NaCl-Reabsorption eine reduzierte NaCl-Menge an die MD. Das Endergebnis der negativen Rückkopplung ist die Autoregulation der GFR auf der Stufe eines einzelnen Nephrons, worin die Autoregulation der Gesamt-GFR der Niere begründet liegt [Aukland und Oien, 1987]. Die physiologische Bedeutung für die Autoregulation der GFR des Huhnes steht zur Diskussion [Vena *et al.*, 1990].

### ***1.2.4. Der Tubulusapparat***

#### ***1.2.4.1. Proximaler Tubulus***

Die Unterteilung des aviären proximalen Tubulus (PT) der RT-Nephrene in eine *Pars convoluta* und *recta* bleibt in der Fachliteratur umstritten [Morild *et al.*, 1985a]. Im Gegensatz dazu lässt sich der PT der medullären MT-Nephrene eindeutig in beide histologisch verifizierbare Segmente unterteilen. Das Epithel des proximalen Tubulus ist iso- bis leicht hochprismatisch und setzt sich aus ca. 12 µm hohen Zellen mit runden, zentral gelegenen Zellkernen zusammen [Johnson, 1979; Wideman, 1988]. Apikal tragen die Epithelzellen einen deutlich ausgebildeten 1 - 1,5 µm breiten Saum aus Mikrovilli; benachbarte Zellen des PT sind über apikale *junctions* mit ausgeprägter Leckage miteinander verbunden [Sperber, 1960; Siller, 1971; Johnson, 1979]. Der Durchmesser des PT der RT-Nephrene nimmt vom Glomerulum ausgehend zur Henleschen Schleife hin zu [Siller, 1971], wobei es sich im Wesentlichen um eine Weitung des Tubuluslumens handelt [Wideman *et al.*, 1981]; das Epithel wird flacher und die Zellen zeigen ein heller gefärbtes Zytoplasma. Der histologisch gesehene Übergang vom PT zur Markschleife bzw. zum intermediären Segment erfolgt sehr abrupt von einer zur nächsten Epithelzelle [Morild *et al.*, 1985a]. Bei einem durchschnittlichen Gesamtvolumen des PT von 35 - 45 µm beläuft sich der mittlere Durchmesser des Tubuluslumens auf 9 - 14 µm [Siller, 1971; Wideman *et al.*, 1981]. Die basolateralen Interdigitationen der Zellmembran sind im Vergleich zu denen von PT-Zellen bei Säugetieren schwach entwickelt, wodurch es zu einer Akkumulation von Mitochondrien in der mediobasalen Zone der Zellen kommt [Sperber, 1960; Ridderstrale, 1980]. Die hohe lokale Konzentrierung der Mitochondrien weist auf ein ausgeprägt transportaktives Epithel hin. Lysosomen, Vakuolen sowie Lipidtröpfchen sind in der subapikalen Region der PT-Zellen lokalisiert. Die MT-Nephrene weisen im Bereich der *Pars recta* weniger Mitochondrien und einen größeren Durchmesser auf als im Bereich der *Pars*

*convoluta* [Siller, 1971; Wideman *et al.*, 1981]. Durch glomeruläre Filtration gelangen große Mengen an Wasser, Biomolekülen (Glukose, Aminosäuren = AS), Mineralien ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) und Elektrolyten ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ) ins Tubuluslumen. Die Hauptfunktion des PT besteht darin, Glukose, AS, Wasser und Elektrolyte für den Organismus wiederzugewinnen. So resorbiert das Huhn über den PT nahezu 100 % der(s) gesamtfiltrierten Glukose, Bikarbonats und AS, sowie 60 % des Wassers [Sykes, 1971].

### Wasser- und Elektrolyttransport

Natriumchlorid wird generell isoosmotisch mit Wasser entlang des lecken PT-Epithels resorbiert. Auch in der Vogelniere erzeugt die basolateral lokalisierte  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase zwischen Tubuluslumen und PT-Zelle ein zelleinwärts gerichtetes Konzentrationsgefälle für  $\text{Na}^+$ . Das Wasser folgt dem transepithelialen osmotischen Gradienten, der durch den Natriumtransport erzeugt wurde [Lavery und Dantzler, 1983; Beyenbach, 1985]. Für die proximale tubuläre Flüssigkeitsabsorption sind reabsorbierte Glukose, AS und Bikarbonat aufgrund des kolloidosmotischen Druckes wichtige Faktoren [Dantzler und Braun, 1980, Dantzler, 1982]. Die über das gesamte Nephron erfolgende, tubuläre Wasserreabsorption der Vögel kann von weniger als 70 % bis zu mehr als 99 % des filtrierten Volumens reichen, wobei die Endkonzentration des Vogelurins von stark hypoton (40 mosm/kg) bis zu hyperton (550 – 900 mOsm/kg) variieren kann [Goldstein und Skadhauge, 2000]. Im Vergleich zum Säugetier, bei dem am Ende des PT 60 - 75 % des filtrierten Volumens reabsorbiert sind [Beyenbach, 1985], erbrachten Messungen für den Star (*Sturnus vulgaris*) lediglich Werte von 18 - 24 % des filtrierten Wassers [Lavery und Dantzler, 1982, 1983]. Mikropunktionsstudien oberflächlich gelegener proximaler Tubuli von RT-Nephronen [Lavery und Dantzler, 1982], sowie Studien an isoliert perfundierten PT tiefer gelegener Nephronen [Brokl *et al.*, 1994] ergaben jedoch auch für das Huhn Resorptionsraten für Wasser von ca. 70 % des filtrierten Volumens am Ende des PT [Beyenbach, 1985]. Calcium wird im PT reabsorbiert, während Magnesium und Phosphor sowohl sezerniert als auch reabsorbiert werden [Lavery und Dantzler, 1982, 1983]. Die Aktivität der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase entlang der basolateralen Membran dient der Aufrechterhaltung des elektrochemischen Diffusionsgradienten und ermöglicht die Funktionalität zahlreicher sekundär aktiver Transportsysteme für die Resorption/Sekretion anderer (Nicht-) Elektrolyte.

Folgende Transportsysteme wurden beim Huhn beschrieben [Renfro und Clark, 1984; Renfro *et al.*, 1987; Kono *et al.*, 2005]:

- Na<sup>+</sup>-abhängiger Glukose Transporter (GLUT-2)
- Na<sup>+</sup>-abhängiger Sulfat / Phosphat Cotransporter
- Na<sup>+</sup> / Protonen Antiporter
- Bikarbonat / Sulfat Antiporter und Protonen / Sulfat Cotransporter

Der elektrogene Cotransport mit Glukose und die elektroneutrale Resorption von Na<sup>+</sup> (Antiport mit Protonen) in die PT-Zelle haben zwei weitere, bedeutsame Auswirkungen, die bereits im Anfangsteil des PT wirksam werden. Zum einen sinkt die Osmolalität der Tubulusflüssigkeit gegenüber dem Niereninterstitium, und zum anderen werden positive Ladungen aus der Tubulusflüssigkeit in das Interstitium verschoben, d.h. die Tubulusflüssigkeit wird gegenüber dem Niereninterstitium negativ geladen. Neben dem dadurch getriebenen parazellulären Chloridtransport strömt Wasser durch membranintrinsische Wasserkanäle (Aquaporine) wie AQP-1 (Kap. 1.4.1) sowie durch die Interzellularverbindungen parazellulär zum Osmolalitätsausgleich aus dem Tubuluslumen in das Interstitium. Bei diesem starken parazellulären Wasserfluss werden gleichzeitig Ionen mitgezogen (*solvent drag*). Dieser *solvent drag* bestimmt die K<sup>+</sup>-Resorption im Bereich des PT und trägt auch wesentlich zur Cl<sup>-</sup>-Resorption bei.

### Transport organischer Anionen und Kationen

Zusätzlich zur Wiedergewinnung von Wasser, Glukose und Elektrolyten aus dem glomerulären Ultrafiltrat sezerniert der PT verschiedene organische Moleküle aktiv aus dem peritubulären Blut in das Tubuluslumen. Generell existieren beim Huhn mindestens je ein Transportsystem für organische Anionen sowie Kationen, welche im Hühnerembryo schon am 9. Tag der Inkubation funktionstüchtig sind [Rennick, 1969]. Das organische Kationen-Transportsystem sezerniert Substanzen wie Cholin, Acetylcholin, Epinephrin, Histamin oder etwa Amilorid in die tubuläre Flüssigkeit [Besseghir und Rennick, 1981a, b; Rennick, 1981]. Bei der Sekretion gelangen organische Kationen über erleichterte Diffusion oder durch aktiven Transport in die Zelle. Der Eintritt positiv geladener Kationen wird unterstützt durch die negative Ladung innerhalb der Zelle. Da über den ausgeprägten Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>-Antiport in PT-Zellen normalerweise ein zelleinwärts gerichtetes Protonengefälle zwischen Tubuluslumen und PT-Zelle erzeugt wird, liefert der Protonengradient eine zusätzliche

treibende Kraft für die Sekretion der organischen Kationen [Wartrous *et al.*, 1970; Rennick, 1981; Milton und Odland, 1985]. Das organische Anionen-Transportsystem sezerniert Harnsäure, Paraaminohippursäure (PAH) oder etwa Furosemid [Rennick, 1967; Milton und Odland, 1985] aktiv durch die peritubuläre Membran gegen einen elektrochemischen Gradienten in das Innere der PT-Zelle. Diese zelluläre Akkumulation bedingt die passive Diffusion oder erleichterten Transport oben genannter Stoffe von der Zelle in das Tubuluslumen [Wartrous *et al.*, 1970; Fujimoto *et al.*, 1973; Milton und Odland, 1985]. Die RT-PCR Analyse zeigt die Expression mehrerer organischer Anionentransporter in PT-Zellen des Huhnes [Dudas *et al.*, 2005]. Der aktive Schritt für organische Kationen geschieht in der luminalen Membran, wohingegen organische Anionen aktiv durch die peritubuläre Membran entgegen des elektrochemischen Gradienten in die Zelle gepumpt werden müssen. Die zwei Systeme sind deutlich voneinander getrennt, jedoch können Substanzen, wie z.B. Kreatinin, die durch Ionisierung sowohl Anionen als auch Kationen bilden können, durch beide Transportsysteme sezerniert werden [Rennick, 1967].

### Azidifizierung

Beim Star konnte in den PT-Zellen mittels Mikropunktionsstudien kein longitudinaler Anstieg der Cl<sup>-</sup>-Konzentration nachgewiesen werden und weitere Studien zeigten eine transepitheliale Potentialdifferenz (TEPD) von durchschnittlich 2,2 mV [Lavery und Dantzer, 1982]. Diese geringfügige TEPD stimmt mit dem Vorherrschen eines lecken Epithels und der Lumennegativität durch die Länge des PT überein, was vermuten lässt, dass in den PT-Zellen des Vogels keine oder nur geringfügige Bikarbonatreabsorption vorhanden ist [Lavery, 1989]. Diese ist beim Säugetier mit einer Carboanhydrase-abhängigen Ansäuerung der Tubulusflüssigkeit assoziiert. Anhand histochemischer Studien lässt sich eine enzymatische Aktivität der Carboanhydrase (CA) im PT des Vogels zwar feststellen, jedoch ist diese im Vergleich zur CA-Aktivität des DT minimal ausgeprägt [Ridderstrale, 1980; Lavery und Alberici, 1987]. Ein von Cox und Mitarbeitern [1985] aus Hühnererythrozyten isoliertes Anionen-Austauscher (band-3) Protein konnte andererseits immunhistochemisch in Zellen des proximalen Tubulus der RT-, nicht jedoch MT-Nephronen nachgewiesen werden. Es vermittelt offensichtlich den elektroneutralen Austausch von intrazellulärem Bikarbonat für peritubuläres Cl<sup>-</sup>. Dieser Anionen-Austauscher könnte beim Vogel die Bikarbonatreabsorption vermitteln und in die renalen Mechanismen

des Säure-Basen-Gleichgewichtes eingebunden sein [Drenckhahn *et al.*, 1985]. Die physiologische Konsequenz der offensichtlichen Umkehrung der Lokalisationen der CA und des Anionenaustauschers in Vögeln, im Vergleich zu Säugetieren, ist nicht bekannt. Direkte Messungen des luminalen pH-Wertes des PT beim Star zeigten Durchschnittswerte von 7,53, welche nicht signifikant unterschiedlich zum pH-Wert des peritubulären Blutes waren. Selbst eine durch HCl-Infusion induzierte Azidose rief keinen signifikanten pH-Wert Unterschied zwischen proximaltubulärer Flüssigkeit und dem peritubulären Blut hervor [Lavery und Alberici, 1987]; der PT der aviären RT-Nephronen zeigte keinen signifikanten Abfall des pH-Wertes der tubulären Flüssigkeit. Der Hauptlocus der urinalen Ansäuerung und Bikarbonatreabsorption bei Vögeln scheint daher das distale Nephron zu sein, und tatsächlich weist das Lumen der corticalen Sammelrohre einen signifikant niedrigeren pH-Wert von 6,5 auf [Lavery und Alberici, 1987; Lavery, 1989]. Die PT-Zellen des Vogels sezernieren Harnsäure und Phosphat [Lavery und Dantzer, 1982, 1983] wobei beide eine signifikante Pufferkapazität gegenüber Wasserstoffionen aufweisen, wodurch ein substantieller Abfall des tubulären pH verhindert wird [Long, 1982; Long und Skadhauge, 1983b]. Aufgrund der geringen Löslichkeit der Harnsäure in sauren Lösungen und des Fehlens protektiver Mukoide im Bereich des aviären PT ist es funktionell vorteilhaft für Vögel, eine Ansäuerung des Urins und hohe Raten der Flüssigkeitsabsorption im Bereich des PT zu vermeiden.

### ***1.2.4.2. Die Markschleife (Ansa nephroni)***

In der Vogelniere existiert eine deutlich ausgebildete Markschleife ausschließlich für die medullären MT-Nephronen (Abb. 2). Sie ähnelt dem kurzen corticalen Typ der Henleschen Schleife (HS) beim Säuger insofern, als sich der Durchmesser am Umschlagspunkt deutlich erweitert. Demzufolge lässt sich ein dünner absteigender Teil (*Pars descendens ansae* = PDA) mit einem im Vergleich zur Säugerniere erhöhten Durchmesser von 11 – 22  $\mu\text{m}$  und einer Epithelhöhe von lediglich 3 – 6  $\mu\text{m}$  klar vom dicken, aufsteigenden Schenkel (*Pars ascendens ansae* = PAA) unterscheiden, dessen Durchmesser bei einer Epithelhöhe von 8  $\mu\text{m}$  bei 18 – 35  $\mu\text{m}$  liegt [Sperber, 1960; Johnson und Mugaas, 1970; Siller, 1971; Ridderstrale, 1980]. Eine PAA der HS, wie sie bei den medullären Nephronen der Säugetiere ausgebildet ist, fehlt den Vögeln [Dantzer und Braun, 1980]. Der Übergang vom PT zum absteigenden Ast der HS geht laut Braun und Reimer, [1988] mit einem

deutlichen Wechsel der Zellmorphologie in Nähe des Markkegels einher. Die abgeflachten Zellen des dünnen Segmentes besitzen einen unregelmäßig geformten, zentral liegenden Kern und benachbarte Zellen sind über apikale *tight junctions* verbunden [Siller, 1971; Michel und Junge, 1972]. Bezüglich der Präsenz basolateraler Interdigitationen bestehen kontradiktorische Aussagen. Siller [1971] vertritt die These, dass keinerlei basolaterale Interdigitationen, jedoch eine geringe Anzahl an Mitochondrien vorhanden sind. Im Gegensatz dazu berichtet Ridderstrale [1980] über die Existenz komplexer, lateraler Interdigitationen bei Abwesenheit von Mitochondrien. Das dicke Segment wird von kubischen Epithelzellen ausgekleidet, die über apikale *tight junctions* verbunden sind und einen zentral liegenden Kern besitzen. Sie tragen wenige apikale Mikrovilli, jedoch sehr komplexe Zellmembraneinziehungen, welche deutlich ausgeprägte Mitochondrien aufweisen [Siller, 1971; Ridderstrale, 1980].

Über die Funktionen der PDA der HS beim Vogel existieren unterschiedliche Meinungen. Ridderstrale [1980] weist darauf hin, dass aufgrund flacher Epithelzellen ein Gleichgewicht zwischen tubulärer Flüssigkeit und medullären Konzentrationsgradienten erreicht werden könnte und folglich ein passiver Eintritt von Teilchen in die tubuläre Flüssigkeit und oder passive Wasserentnahme aus der tubulären Flüssigkeit zu beobachten ist. Siller [1971] argumentiert hingegen aufgrund der abgeflachten Zellstruktur, dass die PDA wenig permeabel für den passiven, transepithelialen Austausch von Elektrolyten und Wasser ist. Außerdem geht Ridderstrale [1980] von der Existenz des parazellulären Stoffwechselweges aus, wenngleich die vorhandenen Mitochondrien eine aktive Transportfunktion für dieses Segment reflektieren. Demgegenüber vermutet Nishimura [1989], dass die ultrastrukturellen Charakteristika der PDA des Vogels ähnlich denen der Säugetiere sind, welche spezifische Aquaporine (AQP-1) (Kap. 1.4.1) besitzen und daher gut wasserdurchlässig, aber nur schlecht permeabel für Elektrolyte sind. Da der Bereich des Markkegels hyperton gegenüber dem Plasma ist, wird im Bereich der PDA der HS der Tubulusflüssigkeit Wasser entzogen; die Tubulusflüssigkeit wird dadurch hyperton und der Harn folglich konzentriert. Je höher die Anzahl der MT-Nephrene, desto größer die Konzentrationsfähigkeit der Vogelniere (Kap. 1.2.5) [Wideman, 1988].

Die PAA der HS dient funktionell als verdünnendes Segment und weist folgende gemeinsame Charakteristika mit der Säugerniere auf: (1) eine geringe Wasserpermeabilität, (2) einen sekundär aktiven NaCl-Transport aus der tubulären Flüssigkeit entgegen dem transepithelialen elektrochemischen Gradienten und (3) eine lumenpositive, transepitheliale Spannung. Diese Charakteristika sind anhand von Untersuchungen an isoliert perfundierten PAAs der HS bei Wachteln und Hühnern ermittelt worden [Stoner, 1985; Miwa und Nishimura, 1986; Nishimura *et al.*, 1986]. Die Elektrolytresorption verläuft dabei über einen aktiven Cotransport von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und 2  $\text{Cl}^-$ -Ionen, wobei als Triebkraft für den Transport wiederum die Aktivität der  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase dient. Die  $\text{Na}^+$ -Ionen werden basolateral durch die  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase hinausgepumpt, und die  $\text{Cl}^-$ -Ionen verlassen die Zelle über basolateral gelegene, spezifische Chloridkanäle. Bei diesem Transport entsteht eine negative Überschussladung auf der Blutseite, so dass eine lumenpositive Potentialdifferenz erzeugt wird. Diese Spannung treibt Kationen parazellulär aus dem Lumen in das Interstitium, d.h. ein Teil der Natriumresorption erfolgt auf parazellulärem Weg in das Interstitium. Die lumen-positive transepitheliale Spannung konnte experimentell durch tubuläre Perfusion mit natrium- oder chloridfreien Lösungen und durch Applikation mit Quabain oder Natrium-cyanid (Blockade der  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase) reduziert bzw. eliminiert werden [Nishimura *et al.*, 1986]. Die PAA der HS des Vogels ist impermeabel für Wasser und das vogelspezifische, antidiuretische Hormon [ $\text{Arg}^8$ ]Vasotocin (= AVT) hatte keinen Einfluss auf NaCl-Transport oder Wasserpermeabilität in diesem Segment [Miwa und Nishimura, 1986]. Durch aktiven Transport des NaCl in das medulläre Interstitium und aufgrund der Tatsache, dass die Interzellularräume in diesem Tubulusabschnitt kaum wasserpermeabel sind, wird der anfangs hypertone Harn während der Passage durch die PAA hypoton. Die PAA gilt unzweifelhaft als wichtigste nephronale Einheit für die Funktion des medullären Gegenstrommultiplikations-Systems auch für den Vogel [Miwa und Nishimura, 1986].

Das intermediäre Segment der RT-Nephronen verbindet direkt das letzte Segment des PT mit dem Anfang des DT am vaskulären Pol des Glomerulum, eine Position, welche in MT-Nephronen durch die Henlesche Schleife eingenommen wird. Die Präsenz des intermediären Segmentes scheint variabel zu sein, manchmal schwer identifizierbar [Huber, 1917; Sperber, 1960; Johnson, 1979; Ridderstrale, 1980; Wideman *et al.*, 1981; Nicholson, 1982;

Nishimura *et al.*, 1986]. Es ist englumig und die Epithelzellen ähneln solchen des distalen Tubulus, wobei der apikale Bürstensaum fehlt [Nicholson, 1982]. Verschiedene Autoren interpretieren das intermediäre Segment als primitive Henlesche Schleife, wobei es sich eher analog zum PAA der Henleschen Schleife verhält [Huber, 1917; Johnson, 1979; Siller, 1971]. Beide Strukturen zeigen eine basale Streifung aufgrund des Vorhandenseins parallel angeordneter Mitochondrien benachbart zur basalen Zellmembran, ein Merkmal, welches im PDA der HS nicht zu erkennen ist [Sperber, 1960]. Die Existenz einer lumenpositiven, transepithelialen Spannung wird für die Kontaktstelle des intermediären Segmentes mit dem vaskulären Pol des Glomerulum bei RT-Nephronen der Wachtel belegt [Nishimura *et al.*, 1986]. Dies deutet daraufhin, dass das intermediäre Segment der RT-Nephronen mindestens ein physiologisches Charakteristikum gemeinsam mit der PAA der HS als „verdünnendes Segment“ aufweist.

### ***1.2.4.3. Distaler Tubulus***

*Per definitionem* beginnt der distale Tubulus (DT) in Übereinstimmung mit der Terminologie beim Säuger am vaskulären Pol des Glomerulum und endet am Verbindungsstück der RT- und MT-Nephronen, also im Übergangsbereich zu den jeweiligen Sammelrohren (Abb. 2) [Johnson, 1979; Ridderstrale, 1980; Nicholson, 1982]. Eine Unterteilung in eine *Pars recta* und eine *Pars convoluta* ähnlich wie beim PT ist in der Vogelniere nicht möglich. Der Außendurchmesser des DT liegt bei ca. 23 µm [Morild *et al.*, 1985a] und das Epithel des frühen distalen Tubulus ist isoprismatisch, enthält runde, zentral gelegene Zellkerne, weist eine Zellhöhe von ca. 8 - 10 µm auf und trägt apikal nur wenige Mikrovilli. Prominente apikale *tight junctions* verbinden benachbarte Zellen. Im Zytoplasma finden sich zahlreiche mikropinozytotische Vesikel. Große, längliche Mitochondrien sind in den komplex gestalteten Interdigitationen der basalen und lateralen Zellmembran eingebettet, ähnlich den Zellen des dicken aufsteigenden Astes der HS und des IS [Siller, 1971; Ridderstrale, 1980]. Je mehr sich der DT der Zentralvene nähert, desto deutlicher machen sich strukturelle Veränderungen bemerkbar. Die apikalen Mikrovilli der Hauptzellen verschwinden, Mitochondrien werden kleiner und runder und die basalen Membraneinziehungen sind weniger komplex [Nicholson, 1982]. Sobald der DT den vaskulären Pol des Glomerulum berührt, zeigen die dortigen Epithelzellen eine unterschiedliche Erschei-

nungsform: Sie sind größer und liegen zusammengedrängt mit eng „verpackten“ Zellkernen und heller gefärbten Zytoplasma als die Nachbarzellen.

Diese Besonderheiten stellen Charakteristika der *Macula densa* dar (Kap. 1.2.3.2). Im Bereich des späten DT kommen folgende drei Zelltypen vor: (1) die Hauptzellen, (2) die interkalierenden Zellen und (3) die Mukus-sezernierenden Zellen. Die Hauptzellen finden sich im gesamten DT lokalisiert, die Mukus-sezernierenden Zellen hingegen vornehmlich auf Höhe der Zentralvene. Die interkalierenden Zellen befinden sich ausgehend von der Wendung des DT bis hin zum Verbindungsstück und kennzeichnen die Übergangszone zum Verbindungsstück [Ridderstrale, 1980].

Anhand experimenteller Studien an isoliert perfundierten DT der Wachtelniereweise wiesen Nishimura *et al.*, [1986] im frühen distalen Tubulus in Nähe des Glomerulum eine lumenpositive Spannung von +2 bis +4 mV nach, welche mit zunehmender Entfernung (300 µm) vom vaskulären Pol des Glomerulum auf negative Werte von -3.2 mV abnahm. Das initiale distale tubuläre Segment der RT-Nephronen scheint somit dem dicken aufsteigenden Ast der HS zu gleichen: Bei basolateraler Lokalisation der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  gelangen  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  über einen in der apikalen Membran sitzenden Furosemid-sensitiven Cotransporter in die Zelle. Natrium wird basolateral retransportiert und  $\text{Cl}^-$  verlässt die Zelle über spezifische  $\text{Cl}^-$ -Kanäle. Das hierfür benötigte Kalium rezirkuliert über die Aktivität der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  und spezifische  $\text{K}^+$ -Kanäle. Das terminale Segment des DT weist zu den DTs bei Säugetieren vergleichbare Eigenschaften auf [Stoner, 1985; Nishimura *et al.*, 1986]. Dort sowie im corticalen Sammelrohr sezernieren interkalierte Zellen Protonen als Austausch für Kalium in das Tubuluslumen [Nicholson und Kendall, 1983; Stoner, 1985]. Die  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  befindet sich entlang der basolateralen Interdigitationen der Hauptzellen des späten DT und hält einen Gradienten für den Natriumeinstrom durch die apikale Zellmembran aufrecht.

Der apikale reabsorptive Natriumfluss ist assoziiert mit einem sekretorischen Kaliumfluss. Zusätzlich zu diesem möglicherweise sättigbaren, sekretorischen Mechanismus für Kalium findet sich ein reziprokes Verhältnis zwischen Kaliumsekretion und urinaler Ansäuerung in den distalen Nephronen der Hühnerniere [Orloff und Davidson, 1959; Wideman und

Braun, 1981]. So säuert der späte DT den Urin an, angepasst an den Kaliumgehalt der tubulären Flüssigkeit, und reabsorbiert zusätzlich Natrium, wobei das Ausmaß der  $\text{Na}^+$ -Reabsorption und  $\text{K}^+$ -Sekretion in Abhängigkeit von der täglichen  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$ -Aufnahme reguliert wird [Stoner, 1985]. Nachfolgende Studien an Hühnern ergaben, dass Kaliumionen und/oder Protonen durch ein Antiportsystem gekoppelt mit einem Natriumeintritt durch die apikale Membran in den Urin sezerniert werden, wobei Kaliumionen und Protonen um denselben Antiporter für den einwärts gerichteten Natriumgradienten konkurrieren. In beiden Fällen bestimmt offensichtlich das intrazelluläre Verhältnis von  $\text{K}^+ : \text{H}^+$ , ob die Kaliumsekretion oder die urinale Ansäuerung vorherrscht [Orloff und Burg, 1960]. Im Falle einer Azidose mit folglich angesäuertem Urin werden die luminalen Protonen durch die drei folgenden Puffersysteme absorbiert: (1) das Harnsäure/Urat System, (2) das  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  System und (3) das  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  System [Long, 1982; Long und Skadhauge, 1983b; Coon und Balling, 1984]. Neben proximalen Tubuluszellen ist auch der DT der Vogelniere durch die Fähigkeit zur  $\text{NH}_3^+$ -Synthese gekennzeichnet. Abhängig vom pH des Urins diffundiert  $\text{NH}_3$  in das tubuläre Lumen, wo es durch Aufnahme eines Protons zum limitiert diffusiblen  $\text{NH}_4^+$  reagiert [Lavery, 1989]. Vögel wie auch Säugetiere reagieren auf eine metabolische Azidose mit signifikanten Anstiegen der tubulären Ammoniumsynthese und folglich auch deren renalen Ausscheidung [Wolbach, 1955; Craan *et al.*, 1983; Long, 1982; Long und Skadhauge, 1983b; Coon und Balling, 1984].

#### ***1.2.4.4. Das Verbindungsstück (Tubulus conjugans)***

Das Verbindungsstück (Durchmesser 30  $\mu\text{m}$ ), für welches drei Zelltypen unterschieden werden können (den Hauptzellen des distalen Tubulus entsprechende Zellen, interkalierende und schleimproduzierende Zellen), bildet den Übergang des distalen Tubulus zum corticalen Sammelrohr in RT-Nephronen (Abb. 2). Charakteristisch ist die Anordnung der drei Zelltypen im Verlauf des Verbindungsstückes. Im proximalen Bereich sind besonders viele Hauptzellen anzutreffen, die im weiteren Verlauf allmählich durch die beiden anderen Zelltypen ersetzt werden. Zum Ende des Verbindungsstückes verschiebt sich das Verhältnis zugunsten der Mukus-sezernierenden Zellen [Nicholson, 1982]. Alle drei Zelltypen weisen ein isoprismatisches Epithel auf und besitzen einen zentrobasal gelegenen, runden Zellkern. Die Schleimzellen sind durch bis zu 2  $\mu\text{m}$  große, muzinhaltige Vakuolen charakterisiert, welche in Nähe der apikalen Plasmamembran lokalisiert sind. Die inter-

kalierenden Zellen besitzen kleine Mikrovilli und zahlreiche mikropinozytische Vesikel im apikalen Zytoplasma. Typisch für die interkalierenden Zellen ist die hohe Anzahl an Mitochondrien, welche oberhalb der Interdigitationen der basalen Zellmembran zu liegen kommen.

Wie schon für den DT beschrieben, sezernieren die Hauptzellen Protonen im Austausch für Kalium [Stoner, 1985]. Daher gehört das Verbindungsstück zu den Hauptorten der renalen Ansäuerung [Nicholson, 1982]. Harnsäure wird entlang des Nephrons zunehmend konzentriert, da Wasser vermehrt reabsorbiert wird und Harnsäure präzipitiert, sobald die tubuläre Flüssigkeit angesäuert ist. Weiße, ausgeflockte Harnsäurepräzipitate wurden erstmals in den oberflächlichen, corticalen Sammelrohren der Vogelniere detektiert [Lavery und Dantzer, 1983]. Mukus, der durch das Verbindungsstück sezerniert wird und weiter distal gelegene Nephronsegmente scheinen zwei Funktionen auszuüben: Erstens sollen sie die Tubuluswand auskleiden und somit verhindern, dass präzipitierte Harnsäure diese schädigt oder das Lumen verengt [Siller, 1971; Mc Nabb *et al.*, 1973; Williams und Nicholson, 1983]. Zweitens dienen die Mukopolysaccharide der Umwandlung der Harnsäure in lyophile Kolloide oder geschichtete Gebilde, die sowohl Natrium als auch Kalium zwischen den einzelnen Schichten einfangen. Harnsäure, die in dieser Form stabilisiert ist, kann leichter das Tubuluslumen passieren [Sykes, 1971; Mc Nabb, 1975; Mc Nabb *et al.*, 1973; Long und Skadhauge, 1983a; Braun, 1991].

### ***1.2.4.5. Das Sammelrohrsystem***

Das Sammelrohrsystem der Vogelniere setzt sich aus corticalen und medullären Bereichen zusammen. Die corticalen Sammelrohre gehen aus den Verbindungsstücken hervor, wobei dieser Übergang stets an der Lappchenperipherie erfolgt (Abb. 2). Sie weisen einen mittleren Durchmesser von ca. 38 µm auf und enthalten Hauptzellen, interkalierende Zellen sowie Mukus-sezernierende Zellen [Morild *et al.*, 1985a]. Charakteristisch ist, dass die Höhe der Epithelzellen in den *perilobulären* Sammelrohren zunächst relativ gering ist und im weiteren Verlauf zunimmt. Der Übergang der corticalen in die medullären Sammelrohre findet auf Höhe der Markkegelbasis statt. Letztere werden von einem hochprismatischen Epithel ausgekleidet, dessen Zellen wenige, kleine Mitochondrien, schwach entwickelte basolaterale Membraneinziehungen, große Vakuolen und Mukusgranula

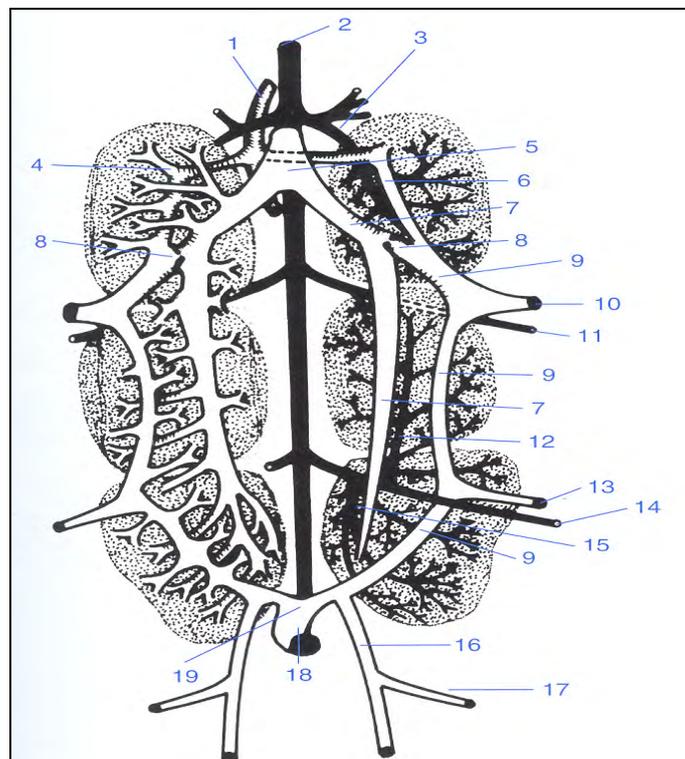
aufweisen [Siller, 1971; Ridderstrale, 1980; Nicholson, 1982]. Die interkalierenden Zellen besitzen keine Schleimvakuolen, aber zahlreiche pinozytotische Vesikel in Nähe der apikalen Plasmamembran, und nehmen prozentual beim Übergang in den medullären Markkegel ab. Die medullären Sammelrohre münden dann abrupt in einen Ureterast zweiter Ordnung (Abb. 2) [Waibl und Sinowatz, 1992].

In der Niere existiert ein osmotischer Gradient zwischen dem *Cortex renalis* und dem Markkegel (Kap. 1.2.5). Die Sammelrohre tauchen dabei auf ihrem Weg vom corticalen in den medullären Markkegel in Regionen mit zunehmender Osmolalität ein. Da der aus dem DT in das Sammelrohrsystem geleitete Harn hypoton ist, entsteht mit fortschreitender Passage durch das Sammelrohrsystem ein osmotischer Gradient zwischen dem Niereninterstitium und der Tubulusflüssigkeit und damit ein zunehmender osmotischer Sog auf das Wasser im Tubuluslumen. Die Interzellularkontakte im SR weisen eine ausgeprägte Impermeabilität für Wasser auf, weshalb dieses vor allem transzellulär *per diffusionem* aus dem Tubulus in das Interstitium gelangt. Die Diffusion durch die luminale und basolaterale Membran erfolgt dabei durch hochspezifische Wasserkanäle (Aquaporine) (Kap. 1.4.1). Schon frühe Tierexperimente zeigten, dass durch das neurohypophysäre Peptidhormon [Arg<sup>8</sup>]Vasotocin eine erhöhte Wasserpermeabilität und so eine zunehmende Osmolalität des Endharns erreicht wird [Skadhauge, 1964] (Kap. 1.3.3.2).

### **1.2.4.6. Die Nierenblutgefäße**

Zu den äußeren Blutgefäßen der Niere gehören die drei Nierenarterien, das zuführende Nierenportadersystem sowie die abführenden Venen (Abb. 3) [Waibl und Sinowatz, 1992]. Die Nierenarterien entspringen getrennt aus den Seitenästen der *Aorta descendens* für jede der drei *Divisiones renales* (Abb. 3). Die *A. renalis cranialis*, welche das craniale Nierensegment versorgt, zweigt aus einem gemeinsamen Stamm mit den Keimdrüsenarterien ab. Andererseits entspringen die *A. renalis media*, welche das mittlere Nierensegment versorgt, sowie die *A. renalis caudalis*, welche zum caudalen Nierensegment zieht, direkt nebeneinander, mit oder ohne gemeinsamen Gefäßstamm, aus der *A. ischiadica*. Die Nierenarterien gehen im weiteren Verlauf in die *Aa. interlobares* über, die über ihre Äste, die *Aa. intralobulares*, das Parenchym erreichen (Abb. 2). Afferente Arteriolen, welche in die MT-Glomerula münden, zweigen direkt von den *Aa. interlobares* bzw. *intralobulares*

ab [Kurihara und Yasuda, 1973]. Afferente Arteriolen, welche in die am weitesten entfernten MT-Glomerula einmünden, zweigen direkt von der *A. intralobaris* ab [Siller und Hindle, 1969; Kurihara und Yasuda, 1973]. Die *A. intralobaris* vermindert ihren Durchmesser, sobald sie abzweigt und in die Peripherie des Läppchens zu den kleineren RT-Glomerula zieht. Die *A. intralobaris* bzw. *A. intralobularis* entlässt die *Arteriolae glomerulares afferentes*, welche das *Rete capillare glomerulare* der Nierenkörperchen bilden. Das *Rete capillare* geht in die *Arteriolae glomerulares efferentes* über, welche die Nierenkörperchen verlassen, um in die peritubulären Kapillaren zu münden. Dabei scheinen die efferenten, glomerulären Arteriolen mit dem kapillären Netzwerk afferenter Venolen zu anastomosieren. Das peritubuläre Blut weist somit arterielle und venöse Anteile auf.



**Abb. 3 :** Schematische Darstellung der Blutgefäße der Hühnerniere.

**1** Anastomose mit dem *Sinus venosus vertebralis internus*, **2** *Aorta abdominalis*, **3** *Arteria renalis cranialis*, **4** eine der vielen *Venae renales craniales*, **5** *Vena cava caudalis*, **6** *Vena portalis renalis cranialis*, **7** *Vena iliaca communis*, **8** *Valva portalis renalis*, Drosselklappe, **9** *Vena portalis renalis caudalis*, **10** *Vena iliaca externa*, **11** *Arteria iliaca externa*, **12** *Arteria renalis media*, **13** *Vena ischiadica*, **14** *Arteria ischiadica*, **15** *Arteria renalis caudalis*, **16** *Vena iliaca interna*, **17** *Vena pudenda*, **18** *Vena mesenterica caudalis*, in die **19** *Anastomosis interiliaca* einmündend (nach Goldstein und Skadhauge [2000]).

Es existiert also beim Vogel, wie auch bei Fischen, Amphibien und Reptilien bekannt, ein den Glomerula nachgeschaltetes Kapillargebiet, das durch Venolen mit den primären, vorgeschalteten Kapillaren des Körperkreislaufs in der Hinterextremität, im Becken und Schwanz sowie in den caudalen Abschnitten des Darmes und der Wirbelsäule verbunden ist [Sperber, 1948]. Somit ist bei diesen Tierklassen ein echtes Nierenpfortadersystem ausgebildet. Die physiologische Bedeutung dieser Aufzweigung von Venen in ein zweites, nachgeschaltetes Kapillargebiet könnte in der höheren Rückresorptionslage von nierenpflichtigen Stoffen, einschließlich Wasser, und in der Harnsäureproduktion begründet sein. Darüber hinaus spielt das renale Pfortadersystem eine wichtige Rolle im Rahmen autoregulatorischer Prozesse zur Konstanthaltung der renalen Durchblutung und GFR [Wideman *et al.*, 1992; Glahn *et al.*, 1993].

### **1.2.5. Harnkonzentrierung beim Vogel**

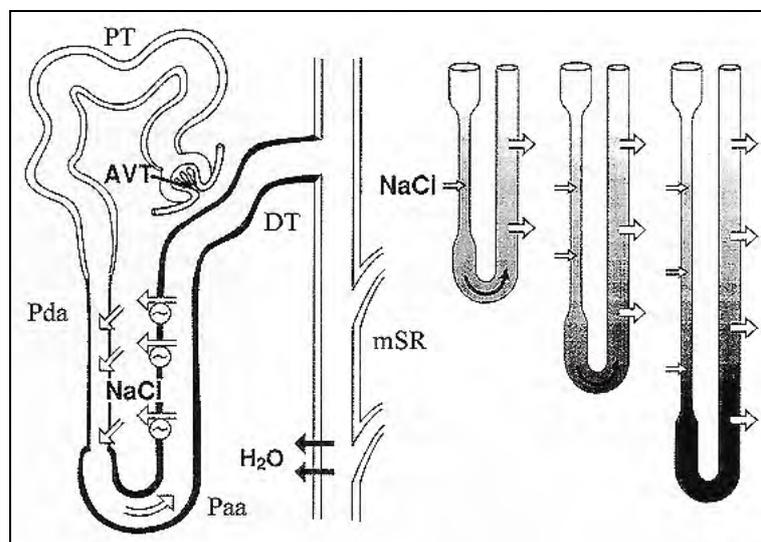
Unter den Vertebraten besitzen nur Säugetiere und Vögel die Fähigkeit, einen gegenüber dem Blutplasma signifikant konzentrierten Endharn zu bilden [Skadhauge und Schmidt-Nielsen, 1967a]. Korr [1939] zeigte als erster, dass Hühner Urin produzieren, der hyperosmotisch zum Plasma ist. Diese Fähigkeit zur Harnkonzentrierung beruht auf einem osmotischen Gradienten im medullären Markkegel, zu dessen Ausbildung folgende Faktoren entscheidend sind: (1) Die NaCl-Resorption des dicken, aufsteigenden Astes der HS (PAA) bei gleichzeitiger Wasserundurchlässigkeit dieses Tubulusabschnittes, wodurch das Interstitium im Bereich der PAA hyperten relativ zur Tubulusflüssigkeit wird, (2) die Anordnung der HS als Haarnadel mit gegenläufiger Flussrichtung, wobei Osmolyte im medullären Markkegel akkumuliert werden (Gegenstromsystem I) und (3) die Anordnung der *Vasa recta* des medullären Markkegels mit gegenläufiger Flussrichtung (Gegenstromsystem II), wodurch die Auswaschung des Osmolalitätsgradienten durch die Durchblutung verhindert wird [Osono und Nishimura, 1994; Nishimura, 1993; Nishimura und Fan, 2003].

Die Kombination aus sekundär aktivem NaCl-Transport (apikaler  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Cotransporter) und sehr geringer Wasserpermeabilität ermöglicht es dem dicken aufsteigenden Ast der HS, an jeder Stelle eine osmotische Druckdifferenz zwischen der Tubulusflüssigkeit und dem umgebenden Interstitium aufzubauen [Ridderstrale, 1980]. Mit fortschreitender

Salzresorption entlang des dicken aufsteigenden Astes der HS weist die Osmolalität im Interstitium einen Gradienten vom *Cortex renalis* zum medullären Markkegel auf [Wideman, 1988]. Höhere interstitielle Osmolalitäten können durch den dicken aufsteigenden Ast der HS nur dadurch erzeugt werden, dass bereits hypertoner Harn mit erhöhter NaCl-Konzentration in den dicken aufsteigenden Ast der HS gelangt. Dies wird durch das Prinzip der Gegenstrommultiplikation erreicht. Der Harn tritt aus dem proximalen Konvolut plasmaisoton in die *Pars recta* ein. Hier und in der nachfolgenden PDA, die beide eine Wasserpermeabilität aufweisen, wird der Harn gegenläufig zu dem von der PAA generierten Osmolalitätsgradienten immer stärker konzentriert und tritt damit schon als hypertoner Harn in die PAA der HS ein (Abb. 4). Damit kann durch die Aktivität des dicken aufsteigenden Astes der HS eine noch höhere interstitielle Osmolalität erzeugt werden. Dies wiederum trägt dazu bei, dass der Harn in dem dünnen absteigenden Ast der HS noch stärker konzentriert wird. Somit entsteht ein sich selbst verstärkender Mechanismus, der dazu beiträgt, dass die NaCl bedingte Osmolalität der Tubulusflüssigkeit am Beginn des dicken aufsteigenden Astes der HS ansteigt und dann infolge der Resorption kontinuierlich abfällt. Der so entstandene Osmolalitätsgradient kann nur dadurch wirksam werden, dass bedingt durch die haarnadelförmige Anordnung der *Vasa recta* sowie durch den relativ geringen Blutfluss durch diese Gefäße NaCl nach der Resorption im Interstitium verbleibt und nicht sofort durch den Blutstrom abtransportiert wird. Aufgrund der hohen Wasserpermeabilität der *Vasa recta* wird den absteigenden Gefäßen entsprechend dem Osmolalitätsgradienten auf dem Weg durch den medullären Markkegel zunehmend Wasser entzogen, und die Osmolalität des Kapillarblutes gleicht sich der interstitiellen Osmolalität an. Der Blutrückstrom durch die parallel verlaufenden aufsteigenden *Vasa recta* verhindert, dass Wasser im corticalen und medullären Markkegel akkumuliert und damit den Osmolalitätsgradienten allmählich auswäscht. Das Blut durchläuft hier Zonen mit abnehmender Osmolalität und nimmt dabei Wasser auf, das den absteigenden *Vasa recta* entzogen wurde. Alle verdünnenden Segmente zeigen keinen Volumenfluss, niedrige osmotische Permeabilität und einen gleichen Nettofluss an gelösten Teilchen (NaCl) [Nishimura und Fan, 2003; Nishimura, 2008].

Harnsäuresalze und -komplexe in Form von Uratkügelchen repräsentieren 55 - 85 % der aviären, renalen Stickstoffausscheidung, Ammonium 6 - 23 % und Harnstoff lediglich 5 -

10 % [Skadhauge, 1981; Braun, 1991]. Aufgrund der Tatsache, dass Vögel lediglich sehr limitiert aus essentiellen Arginin und Citrullin Harnstoff bilden können, wird dementsprechend wenig Harnstoff über den aviären Urin ausgeschieden [Chu und Nesheim 1979; Kwong *et al.*, 1982]. Damit entwickelte sich das Gegenstrommultiplikationssystem im Gegensatz zum dualen System des Säugers (NaCl und Harnstoff) zu einem „single electrolyte system“ [Skadhauge und Schmidt-Nielsen, 1967b; Skadhauge, 1977]. Vergleiche der maximalen Konzentrationsfähigkeit der Säuger- und Vogelnieren zeigen, dass das Vogelssystem weniger effektiv arbeitet als das duale System der Säugetiere [Shoemaker, 1972].



**Abb. 4 :** Darstellung des postulierten Modells der Harnkonzentrierung des Vogels. Tubuläre Segmente mit dicker Begrenzung weisen eine geringe Wasserpermeabilität auf. Mögliche Reaktionsbindungsstellen einschließlich der Arginin-Vasotocin-induzierten Reduktion der filtrierten Ladung, die Stömungssensibilität des dicken aufsteigenden Astes und der Wasserpermeabilität der Sammelrohre sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die rechte Hälfte des Bildes zeigt den hypothetischen Kaskadeneffekt des Konzentrationsmechanismus, der aus dem Vorhandensein der unterschiedlich langen Henleschen Schleifen resultiert. Aus Nishimura [1993].

Nishimura und Fan [2003] bestätigen diese Annahme durch die Beobachtung, dass interessanterweise in der PAA der Wachtelniere der Nettofluß von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  höher ist als der in verdünnenden Segmenten anderer Tiere. Dies lässt vermuten, dass das verdünnende Segment des Vogels mehr Energie benötigt, um das Gegenstrommultiplikationssystem einzig durch das „Recyclen“ von NaCl aufrecht zu erhalten. Die mangelnde Fähigkeit der Vogelniere zur Harnkonzentrierung äußert sich im Vergleich der maximalen Urinosmolalität

zwischen Säuger und Hausgeflügel: Bei einer Plasmaosmolalität von ca. 290 - 320 mOsm/kg beträgt sie bei den adulten Haussäugetieren zwischen 1100 (Schwein) und 3500 (Schaf) mOsm/kg, beim Hausgeflügel (Ente, Huhn, Pute) dagegen nur zwischen 600 und 700 mOsm/kg [Gerstberger *et al.*, 1985; Goldstein und Braun, 1989; Goldstein und Skadhauge, 2000]. Die maximale Konzentrationsfähigkeit der Gesamtniere korreliert mit dem numerischen Verhältnis von MT: RT Nephronen [Johnson und Mugaas, 1970; Roberts und Baudinette, 1984; Warui und King, 1985], da nur die MT-Nephronen über eine ausgeprägte Henleschleife verfügen [Wideman, 1988].

### **1.3. Hormonale Kontrolle der renalen NaCl- und Wasserresorption beim Vogel**

Tubuläre Resorptions- und Sekretionsvorgänge im Bereich des proximalen Tubulus (PT) sind vornehmlich durch biophysikalische Vorgänge geregelt (transzelluläre Transportmechanismen, parazellulärer Ionenfluss, *solvent drag*, glomerulotubuläre Balance etc. (Kap. 1.2.4.1). Sowohl die dünne absteigende, als auch die dicke aufsteigende Komponente der HS dienen in erster Linie der Konzentrierung des Harns (Kap. 1.2.5), wobei wie erwähnt die Dichtigkeit des dicken aufsteigenden Schenkels für Wasser sowie die Präsenz des  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  Cotransporters von Bedeutung ist [Stoner, 1985; Miwa und Nishimura, 1986; Nishimura *et al.*, 1986]. Im Gegensatz zu den Transportmechanismen des PT und der HS unterliegt die Resorption von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  und Wasser im Bereich des DT sowie der Sammelrohre der Kontrolle durch zirkulierende Hormone, wobei den „vier großen A“, nämlich Angiotensin II (AngII), Aldosteron (ALDO), Atriales natriuretisches Peptid (ANP) und Antidiuretisches Hormon (ADH), besondere Bedeutung zukommt:

#### **1.3.1. Angiotensin II (AngII) und Aldosteron (ALDO)**

Die physiologische Funktion des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS) besteht in der Aufrechterhaltung eines adäquaten Volumens der extrazellulären Flüssigkeit. Renin wird in den granulären, epitheloiden Zellen der Vogelnieren gebildet und bei einer Reduktion des arteriellen Perfusionsdruckes bzw. extrazellulärer Hypovolämie ins Blut abgegeben [Gray und Simon, 1985; Wideman *et al.*, 1993]. Im Rahmen des klassischen, zirkulierenden Renin-Angiotensin Systems (RAS) spaltet Renin auch bei Vögeln das Dekapeptid Angiotensin I (AngI) N-terminal aus dem zirkulierenden  $\alpha$ -Globulin Angiotensinogen [Takei *et al.*, 2004]. Durch die Peptidase *angiotensin converting enzyme* (ACE) wird ein

weiteres Dipeptid von AngI abgespalten, so dass das vogelspezifische Oktapeptid [Val<sup>5</sup>] Angiotensin II (AngII) entsteht. Darüber hinaus wird zumindest für Säugetiere auch die Existenz eines intrarenalen RAS diskutiert [Kobori *et al.*, 2007]. So übt das Renin-Angiotensin-System eine direkte intrarenale Kontrolle des Natriumtransportes bei Vögeln aus [Wideman *et al.*, 1981]. Bei einer geringen Rezeptordichte für AngII in den Glomerula der Hühnerniere [Nishimura *et al.*, 2003] bedingte AngII, appliziert in das renale Pfortadersystem wacher Hähne in lediglich nanomolaren Konzentrationen [Cuypers *et al.*, 1993], sowie systemisch bei narkotisierten Hennen in supraphysiologischen Konzentrationen [Stallone und Nishimura, 1985], eine Diurese und Natriurese, zurückzuführen auf eine Erhöhung sowohl der GFR als auch des effektiven renalen Plasmaflusses. Physiologisch relevante Studien hingegen zeigten eine Antidiurese/Antinatriurese bei niedrig dosierter AngII Applikation für Enten und Möwen (*Laridae*) [Gray und Erasmus, 1989; Heinz und Gray, 2001].

Im Gegensatz zu der bei Säugern hochpotenten, vasokonstriktorischen Wirkung des AngII konnte für das Huhn sowie die Wachtel ein biphasisches Reaktionsmuster mit primärer, endothelabhängiger Vasorelaxation, gefolgt von einer arteriolen Vasokonstriktion gezeigt werden [Nishimura *et al.*, 1982; Takei und Hasegawa, 1990]. Die für die Vasokonstriktion notwendigen AngII Plasmakonzentrationen lagen dabei weit im supraphysiologischen Bereich [Robinzon *et al.*, 1995]. Bei der wachen Ente konnte systemisch appliziertes AngII ebenfalls erst in pharmakologischen Dosierungen den systemischen Blutdruck erhöhen [Brummermann und Simon, 1990]. Eine signifikante Reduktion der Kapillardurchblutung ergab sich dabei lediglich für Komponenten des Magendarmkanals, die supraorbitalen Salzdrüsen sowie die Nieren [Gerstberger, 1991].

Bei Vögeln wie bei Säugtieren vermittelt durch Hypovolämie der EZF induziertes AngII die zentralnervös medierte Stimulation des Trinkverhaltens inklusive des Suchens nach Wasser sowie des eigentlichen Trinkaktes [Simon *et al.*, 1992; Fitzsimons, 1998; Takei, 2000]. Dabei steht die Aktivierung spezifischer Neurone im Bereich des *Organum subfornicale* (SFO), eines circumventrikulären Organs des anterioren Hypothalamus ohne ausgeprägte endotheliale Blut-Hirn Schranke, als Zielstruktur für zirkulierendes AngII im Vordergrund [Takei, 1977; Simon *et al.*, 1992; Simon und Schmid, 1996]. Die Expression

AngII-spezifischer Rezeptorproteine in Neuronen des SFO konnte für Huhn, Ente und Wachtel durch Injektions- und Läsionsstudien *in vivo* [Volmert und Firman, 1992; Simon und Schmid, 1996], sowie elektrophysiologische [Schmid und Simon, 1992; Schäfer *et al.*, 1996] und rezeptoranalytische Untersuchungen [Gerstberger *et al.*, 1987; Müller und Gerstberger *et al.*, 1994; Natke *et al.*, 1996] *in vitro* nachgewiesen werden.

Neben seinen direkten renalen Aktivitäten im Rahmen der Homöostase der EZF, stellt AngII auch den wesentlichen Stimulus für die Induktion der Bildung und Freisetzung des Aldosterons (ALDO) aus der Nebenniere des Vogels dar [Gray *et al.*, 1989; Collie *et al.*, 1992]. Unterschiedlich zur Nebenniere des Säugers findet sich beim Vogel keine klare Zonierung in Cortex und Medulla; corticale, Steroidhormon-produzierende Gewebeareale liegen mit medullären, Katecholamin-synthetisierenden Einheiten vermischt vor [Klingbeil, 1985; Carsia und Weber, 2000]. Wie bei der Säugerniere wird auch für die Niere des Vogels eine natriumretinierende Funktion für ALDO diskutiert [Charest-Boulé *et al.*, 1978; Carsia und Weber, 2000].

Die molekularbiologische Klonierung bzw. die detaillierte pharmakologische Charakterisierung gelang für vogelspezifische AngII Rezeptorproteine vor allem (a) in den Endothelien, nicht jedoch glatten Muskelzellen, von Blutgefäßen des Huhnes [Kempf und Corvol, 2001; Nishimura *et al.*, 1994, 2003], (b) der subkapsulären Zone der Nebenniere von Huhn, Truthahn (*Meleagris gallopavo*) und Ente [Schäfer *et al.*, 1996; Nishimura *et al.*, 2003] (c) der Niere von Huhn, Spatz (*Passer domesticus*) und Truthahn [Kempf *et al.*, 1999; Handa *et al.*, 2001; Nishimura *et al.*, 2003] sowie (d) dem *Organum subfornicale* der Ente [Schäfer *et al.*, 1996; Simon und Schmid, 1996]. Unabhängig von ihrer Lokalisation implizieren alle verfügbaren Daten, dass der vogelspezifische AngII Rezeptor einen atypischen Rezeptor darstellt, der nur bedingt mit den beim Säugetier vorkommenden AT<sub>1</sub> oder AT<sub>2</sub> Rezeptor-Subtypen zu vergleichen ist.

### ***1.3.2. B- und C-Typ spezifische natriuretische Peptide***

Atriales natriuretisches Peptid (ANP), brain natriuretic peptide (BNP) und C-Typ natriuretisches Peptid (CNP), zuerst im Zentralnervensystem der Säugetiere entdeckt, repräsentieren die wichtigsten Vertreter der natriuretischen Peptidfamilie (NP) [Toop und Donald, 2004]. In allen drei Fällen handelt es sich um C-terminale Peptide, welche an den NP-

Rezeptor-Subtyp A (ANP, BNP), -Subtyp B (CNP) oder -Subtyp C (ANP, BNP, CNP) binden. Während NPR-A und NPR-B über eine intrazelluläre Domäne mit Guanylatcylase-Aktivität verfügen, repräsentiert NPR-C einen renalen Clearance-Rezeptor. Neueste molekularbiologische Charakterisierungen des Vogel- und Reptiliengenoms haben ergeben, dass ANP bei allen bis *dato* untersuchten diapsiden Reptilien- sowie Vogelspezies (Huhn, Taube (*Columbida*)) genetisch nicht kodiert wird [Houweling *et al.*, 2005; Trajanovska und Donald, 2008]. Auf Gen- sowie Proteinebene konnte lediglich die Expression von BNP und CNP-3 sowie dem kürzlich entdeckten VNP (ventrikuläres NP) vorwiegend in den Atrien und Ventrikeln des Herzens von Huhn, Ente, Taube oder Wachtel nachgewiesen werden [Miyata *et al.*, 1988; Toshimori *et al.*, 1990; Schütz *et al.*, 1992; Mifune *et al.*, 1996; Takei *et al.*, 2007; Trajanovska *et al.*, 2007]. Die Expression eines CNP-1 ortho-logen NPs ist beim Huhn auf das Gehirn sowie möglicherweise das Darm-intrinsische Nervensystem beschränkt [Trajanovska *et al.*, 2007], und CNP-3 sowie VNP werden darüber hinaus von noch zu spezifizierenden Zellen der Vogelniere synthetisiert [Takei *et al.*, 2007; Trajanovska *et al.*, 2007].

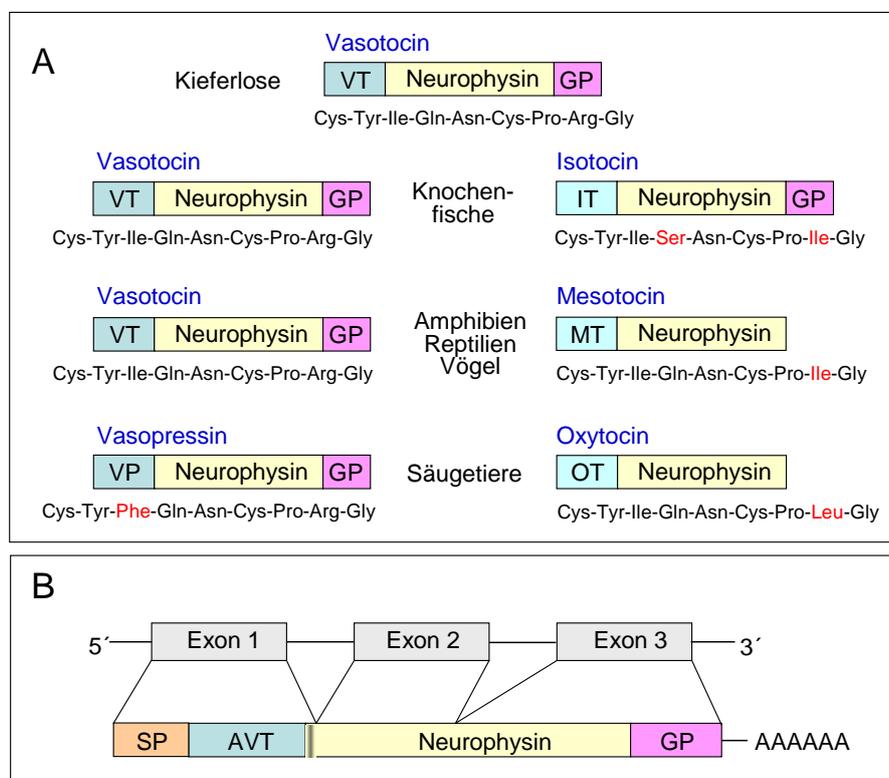
Erste physiologische Studien hinsichtlich der Bedeutung der NPs für die renale Ionen- und Wasserelimination bei Vögeln wurden mit humanem ANP durchgeführt. So induzierte die systemische Applikation von humanem ANP<sub>5-28</sub> beim Huhn eine renale Vasodilatation, Diurese und Natriurese [Gregg und Wideman, 1986]. Springate *et al.*, (1987) infundierten Hühnern humanes ANP direkt in das Portalgefäßsystem der Niere des Huhnes, wodurch eine Steigerung der renalen Diurese und Natriurese bei unveränderter GFR und Nierendurchblutung hervorgerufen werden konnte; dabei wurden die Markkegel als mögliche Zielstrukturen für ANP diskutiert. Die Verfügbarkeit von vogelspezifischem BNP ermöglichte detaillierte Untersuchungen zur renalen Funktion bei Spatz, Huhn sowie der Ente. Die zuvor beschriebenen, möglichen tubulären Wirkungen von humanem ANP beim Huhn [Springate *et al.*, 1987] ließen sich unter Verwendung von BNP an der Spatzenniere nicht verifizieren [Goldstein *et al.*, 1999]. Bei Huhn und Ente führte BNP-Applikation dosisabhängig zu einer gesteigerten Diurese und Natriurese; für die Ente konnte durch Einsatz von renalen Clearance-Techniken eine gleichzeitige Erhöhung der GFR und des effektiven renalen Blutflusses bestimmt werden [Schütz *et al.*, 1992; Gray, 1993]. Bindungsstudien mit radioiodiniertem BNP dienten der pharmakologischen Charakterisierung spezifischer

Bindungsstellen auf der Ebene der RT-Glomerula sowie limitiert des Sammelrohrsystems [Schütz *et al.*, 1992]. Mit Hilfe eines gegen BNP des Huhnes gerichteten, polyclonalen Antiserums konnte es ermöglicht werden, physiologische Änderungen der BNP-Plasmakonzentration etwa nach isotoner Volumenexpansion (A), vaskulärer Hypovolämie (B) oder Volumendepletion der EZF durch Dehydratation (C) bei Ente und Huhn zu ermitteln. So bedingte(n) A eine Zunahme, B und C eine Reduktion an zirkulierendem BNP [Gray *et al.*, 1991b; Gray, 1993]. Sowohl cardiac als auch intrarenal gebildetes CNP-3 [Trajanovska *et al.*, 2007] könnte darüber hinaus verantwortlich sein für die ausgeprägt diuretische und natriuretische Aktivität von vogelspezifischem CNP bei der Ente. Die Funktionalität der renalen Rezeptoren vermutlich des B-Subtyps konnte durch die CNP-induzierte Bildung von cGMP als second messenger in RT- und MT-Glomerula sowie distalen Tubuli der Entenniere nachgewiesen werden [Brenner und Gerstberger, 1999]. Für die wache Stockente konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass systemisch in physiologischen Konzentrationen verabreichtes BNP bei eu-, vor allem aber dehydrierten Tieren zu einer Verringerung der Plasmaspiegel an ALDO führte [Gray *et al.*, 1991a]. In primär kultivierten Zellen der Nebenniere des Huhnes konnte eine cGMP vermittelte Verminderung der ALDO-Freisetzung durch BNP nachgewiesen werden [Rosenberg *et al.*, 1989]. Natriuretische Peptide und Komponenten des RAAS scheinen also hinsichtlich der hormonalen Kontrolle des Salz- und Wasserhaushaltes als Gegenspieler zu fungieren [Gerstberger *et al.*, 1985; Gray, 1993; Brenner und Gerstberger, 1999].

### **1.3.3. [Arg<sup>8</sup>]Vasotocin - das antidiuretische Hormon der Vögel**

Neurohypophysäre Hormone sind zyklische Nonapeptide, die physiologische Prozesse im Rahmen der Wasser- und Elektrolythomöostase, der Aufrechterhaltung des Blutdruckes sowie der Reproduktion regulieren [Voigt, 2003]. So wird die Wasserausscheidung durch die Vogelnie ren in erster Linie hormonell durch das Peptidhormon [Arg<sup>8</sup>]Vasotocin (AVT) kontrolliert, welches in seiner Wirkung als antidiuretisches Hormon der Vögel erstmals von Munsick und Mitarbeitern beschrieben wurde [Munsick *et al.*, 1960; Munsick, 1964]. Phylogenetisch stellt AVT möglicherweise das „Muttermolekül“ aller neurohypophysären Nonapeptide der Vertebraten dar und konnte schon bei den Cyclostomata nachgewiesen werden [Acher und Chauvet, 1988; Acher 1996]. AVT wird bis zur Klasse der Vögel exprimiert; bei Säugetieren wird es nach Austausch lediglich einer Aminosäure durch

Punktmutation (Phenylalanin anstelle von Isoleucin in Position drei) durch [Arg<sup>8</sup>]Vasopressin ersetzt (Abb. 5A). Bei den Vertretern der Suidae kommt es zur Expression des [Lys<sup>8</sup>]Vasopressin. Genduplikation mit anschließender Punktmutation führte auf der Ebene der Knochenfische zur Entstehung eines zweiten Hormonsystems mit Isotocin als wichtigstem Vertreter, welches bei Amphibien, Reptilien und Vögeln durch weitere Punktmutationen in Mesotocin, bei Säugetieren schließlich Oxytocin übergegangen ist (Abb. 5A). Neurohypophysäre Peptidhormone der Vertebraten stellen also bezüglich ihrer Struktur hoch konservierte, zyklische Nonapeptide mit einem Molekulargewicht von etwa 1 kD dar, wobei eine Disulfidbrücke die Hemicysteinreste der Aminosäurepositionen eins und sechs



**Abb. 5 :** Gen- und Peptidstruktur des aviären [Arg<sup>8</sup>]Vasotocin.

(A) : Phylogenetische Entwicklung des neurohypophysären Nonapeptidsystems durch sequentielle Punktmutationen führt zur Entwicklung von Vasopressin- (links) bzw. Oxytocin-ähnlichen (rechts) neurosekretorischen Peptidhormonen. Die Pro-Hormone enthalten die Sequenzen für das jeweilige Nonapeptid (VT = Vasotocin, VP = Vasopressin, IT = Isotocin, MT = Mesotocin, OT = Oxytocin), ein Neurophysin als Trägerprotein sowie teilweise ein C-terminales Glycopeptid (GP).

(B) : Das Präpro-Hormon des AVT, für welches 3 Exone kodieren, weist zusätzlich ein N-terminales Signalpeptid (SP) für das posttranslationale Processing auf der Ebene des endoplasmatischen Retikulum auf (modifiziert nach Köhler [2000]).

verbindet. Von den neun Aminosäuren erweisen sich vier, nämlich die Positionen eins, sechs, sieben sowie neun, als bei allen neurohypophysären Peptidhormonen konserviert. Hormone des Hypophysenhinterlappens (HHL) mit nichtpolaren Aminosäuren an Position acht sind als „neutrale HHL-Peptide“ bekannt und bilden die Oxytocin-ähnliche Unterfamilie; jene mit einer basischen Aminosäure in der oben genannten Position sind als „basische HHL-Peptide“ bekannt und stellen die Vasopressin-ähnliche Unterfamilie dar [Sawyer, 1977] (Abb. 5A).

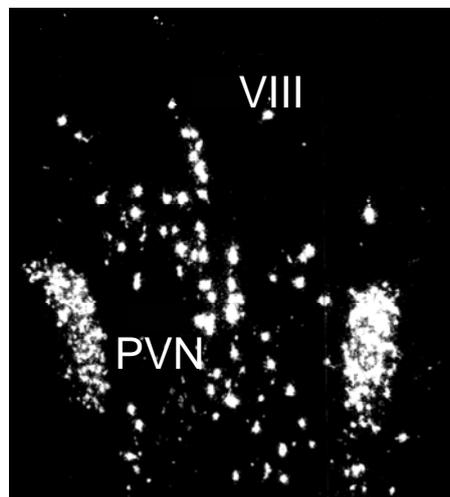
Australische Beuteltiere weisen sowohl Mesotocin als auch Oxytocin als neutrale Nonapeptide, sowie [Arg<sup>8</sup>]AVP bzw. [Lys<sup>8</sup>]AVP als basisches Nonapeptid auf [Gemmell und Sernia, 1989; Bathgate und Sernia, 1995], wohingegen südamerikanische Opossums neben Oxytocin sowohl [Arg<sup>8</sup>]AVP, [Lys<sup>8</sup>]AVP und/oder Phenylpressin synthetisieren können [Chauvet *et al.*, 1985; Acher und Chauvet, 1988].

### ***1.3.3.1. Biosynthese, axonaler Transport und geregelte Freisetzung des AVT***

Wie die meisten Vertebraten exprimieren die Vögel zwei neurohypophysäre Hormone. Vasotocin (AVT) ist wie bei allen Nichtsäugetiervertebraten das repräsentative basische HHL-Hormon, wohingegen Mesotocin das neutrale HHL-Hormon repräsentiert. AVT und Mesotocin stellen Homologe der säugerspezifischen Hormone AVP und Oxytocin dar [Acher und Chauvet, 1988]. Die molekularbiologische Klonierung des AVT-Genes gelang erstmals für das Huhn durch Hamann und Mitarbeiter [1992]. Ähnlich wie für das AVP-Gen der Ratte beschrieben [Ivell und Richter, 1984], besteht das AVT-Gen der Vögel aus drei Exons mit intermittierenden Introns (Abb. 5B). Wie aufgrund der Genduplikation zu vermuten, finden sich das AVT- sowie das Mesotocin-Gen des Huhnes eng gekoppelt (auf Chromosom-4), jedoch mit einer Schwanz-zu-Kopf Anordnung der jeweiligen Basensequenzen, also umgekehrt wie für AVP- und Oxytocingene der Ratte und des Menschen beschrieben [Gwee *et al.*, 2008].

Das vogelspezifische [Arg<sup>8</sup>]Vasotocin wird vornehmlich in den magnozellulären Neuronen der paraventriculären (PVN) (Abb. 6) und supraoptischen (SON) Kerngebiete des medialen Hypothalamus synthetisiert, wie immunhistochemisch für Huhn [Jurkevich *et al.*, 1997; Köhler, 2000], Ente [Bons, 1980a] oder die Japanische Wachtel (*Coturnix coturnix*

*japonica*) [Bons, 1980b; Seth *et al.*, 2004a] nachgewiesen. Darüberhinaus finden sich parvozelluläre AVTerge Neurone im Bereich des *Nucleus suprachiasmaticus* sowie den periventrikulären Zonen P2 und P3 des Huhnes [Sanchez *et al.*, 1991] sowie dem *Nucleus striae terminalis* (NST) der Wachtel [Absil *et al.*, 2002]. Lediglich bei Hähnen, nicht jedoch Hühnern exprimieren zusätzlich parvozelluläre Neurone im Bereich des dorsalen *Diencephalon* sowie des NST, der anterioren präoptischen Region und des *Organum vasculosum laminae terminalis* AVT [Jurkevich *et al.*, 1997]. Mittels AVT mRNA-spezifischer Oligonukleotid-Proben konnte durch *in situ* Hybridisierung die Genexpression für AVT ebenfalls in den eben genannten Kerngebieten für Huhn [Chaturvedi *et al.*, 1994; Jaccoby *et al.*, 1997; Barth und Grossmann, 2000] und Wachtel [Seth *et al.*, 2004a] gezeigt werden.



**Abb. 6 :** *In situ* Hybridisierung für AVT mRNA im Hypothalamus des Huhnes.

Mit Hilfe einer AVT mRNA-spezifischen, [ $\alpha^{33}\text{P}$ ]dCTP markierten cDNA-Probe läßt sich die zelluläre Expression in Neuronen des *Nucleus paraventricularis* (PVN) in unmittelbarer Nähe des dritten Hirnventrikels (VIII) in einem coronalen Gehirnschnitt (20  $\mu\text{m}$  Schnittdicke) des Gehirns eines Huhnes nachweisen. Balkenlänge: 200  $\mu\text{m}$ , aus: Jurkevich *et al.* [1997].

Nach Transkription und posttranskriptionaler Prozessierung kodiert die entsprechende mRNA vorrangig in den magnozellulären Neuronen von PVN und SON für Präpro-AVT. Nach Abtrennung der N-terminalen Signalsequenz bei Eintritt des Präpro-AVT in das raue ER entsteht Pro-AVT, und aus diesem durch weitere posttranslationale Proteolyse das n-terminale Nonapeptid AVT = Vasotocin, ein als Neurophysin II bezeichnetes Protein sowie ein Glycoprotein (GP). Das Neurophysin II dient als Trägerprotein für AVT

während seines Transportes vom Ort der Biosynthese entlang der Axone der magnozellulären Neurone, die als *Tractus supraopticohypophysaeus* in den Hypophysenhinterlappen (HHL) des Huhnes ziehen. Dabei diskutieren Hamann und Mitarbeiter [1992], dass es beim Vogel möglicherweise nicht - wie für das AVP-System der Säuger gesichert - zu einer Trennung von Neurophysin und GP während des axonalen Transportes kommt. AVT wird in den axonterminalen Strukturen des HHL in Granula gespeichert und bei Bedarf direkt, also neuroendokrin, in die Blutbahn entlassen.

Den bei Vögeln am stärksten ausgeprägten Stimulus für die Freisetzung des Vasotocins aus dem HHL stellt die Oviposition dar. So ergab sich bei Legehennen zum der Eiablage unmittelbar vorausgehenden Zeitpunkt ein Anstieg des Plasma-AVT auf Werte von 200 pg/ml bei gleichzeitiger Reduktion des neurohypophysär gespeicherten Nonapeptidgehaltes [Sasaki *et al.*, 1998]. Der wichtigste Reiz für die Vasotocinsekretion im Rahmen der Osmoregulation sind minimale (ca. 1 Prozent) Änderungen der extrazellulären Ionenkonzentration oder des EZF-Volumens (2 - 3 Prozent), die durch systemische sowie im Hypothalamus gelegene Osmo- und/oder Natriumsensoren [Gerstberger *et al.*, 1997], bzw. im Niederdrucksystem gelegene Volumenrezeptoren [Keil *et al.*, 1994; Simon-Oppermann *et al.*, 1994] registriert und an PVN bzw. SON neuronal weitergeleitet werden. Eine Depolarisierung der Axonendigung bewirkt über den Prozeß der Elektrosekretionskopplung die exozytotische Ausschüttung aus den Neurosekret-Granula in die systemische Blutbahn [Grossmann und Ellendorff, 1986]. Neben einer zentral vermittelten Änderung der Antriebskraft, Wasser zu trinken, werden periphere osmoregulatorische Zielorgane wie die Nieren, das kardiovaskuläre System oder die supraorbitalen Salzdrüsen über das autonome nervale System und (Neuro-)Hormone wie eben AVT nachträglich aktiviert oder inhibiert, um die extrazelluläre Tonizität bzw. das EZF-Volumen wiederherzustellen [Gerstberger *et al.*, 1997].

Unter euhydrierten Bedingungen zirkuliert das hydrophile Nonapeptid AVT als freies Hormon in der Blutbahn in Konzentrationen von typischerweise 5 - 20 pg/ml bzw. fmol/ml [Möhring *et al.*, 1980; Arad und Skadhauge, 1984; Stallone und Braun, 1986a, b; Goldstein und Bradshaw, 1998; Chaturvedi *et al.*, 2000], bei einer biologischen Halbwertszeit  $t_{1/2}$  von lediglich 1 - 2 Minuten [Gray und Simon, 1983; Stallone und Braun, 1986a; Gray und

Erasmus, 1988]. Als das wichtigste osmoregulatorische Hormon des Vogels, neben AngII und ANP [Wilson, 1989; Schütz *et al.*, 1992; Simon *et al.*, 1992] steht AVT bezüglich seiner Freisetzung primär unter osmotischer und erst sekundär unter volämischer Kontrolle. Dehydratation durch transienten Wasserentzug für zwei Tage bzw. die systemische Applikation einer hypertonen Kochsalzlösung führten zu einer signifikant erhöhten AVT-Expression auf Ebene des PVN sowie SON bei Huhn und Wachtel [Chaturvedi *et al.*, 1994, 2000; Jaccoby *et al.*, 1997]. Plasmawerte für zirkulierendes AVT erwiesen sich schon nach 1 - 2 tägigem Wasserentzug als markant erhöht bei Huhn [Koike *et al.*, 1977; Gray und Simon, 1983; Stallone und Braun, 1986b] und Wachtel [Seth *et al.*, 2004a]. Die isotope Expansion bzw. Reduktion des Plasmavolumens ( $\pm 10\%$  des Gesamtblutvolumens) sowie die durch hyperonkotische Dextran-70 Infusion erzeugte Zunahme des Plasmavolumens auf Kosten des interstitiellen Flüssigkeitsraumes - bei unveränderter Plasmaosmolalität - hingegen verursachten bei der Stockente (*Anas platyrhynchos*) lediglich geringfügige Änderungen der zirkulierenden AVT-Konzentration [Simon-Oppermann *et al.*, 1984; Keil *et al.*, 1994].

### **1.3.3.2. Renales Wirkungsspektrum des AVT**

Als hauptsächlichen, funktionellen Unterschied zu den neurohypophysären Nonapeptidsystemen der Säuger weist das vogelspezifische [Arg<sup>8</sup>]Vasotocin sowohl Funktionen im Rahmen der Reproduktion (vergleichbar dem Oxytocin) als auch der Wasser- und Elektrolythomöostase (vergleichbar dem AVP) auf. So konnten mehrere Arbeitsgruppen die Bedeutung erhöhter AVT-Spiegel im Plasma für die Oviposition bei Huhn und Wachtel aufzeigen [Sturkie und Lin, 1966; Nouwen *et al.*, 1984; Shimada *et al.*, 1986; Koike *et al.*, 1988]. Dabei scheint Vasotocin zusammen mit Prostaglandinen die Induktion der Uteruskontraktion herbeizuführen, wobei sowohl die Sensitivität der Uterusmuskulatur als auch deren Rezeptordichte für AVT während der Eiablage maximal erhöht sind [Saito *et al.*, 1987; Koike *et al.*, 1988]. Darüberhinaus vermag AVT als hypothalamischer Neurotransmitter durch Neuromodulation des limbischen Systems reproduktives und sexuelles Verhalten zu beeinflussen, wie etwa das kopulative Verhalten bei Hähnen [Kihlstrom und Danninger, 1972; Moore, 1992] oder die Bereicherung des vokalen Repertoires bei Singvögeln [Maney *et al.*, 1997].

Die paarigen Nieren stellen das wichtigste Zielorgan des aviären AVT im Rahmen der Homöostase des Salz- und Wasserhaushaltes dar, vergleichbar der immensen Bedeutung des AVP für die Kontrolle der renalen Wasserelimination bei Säugern [Voigt, 2003]. Bei diesen besteht der primäre Mechanismus der AVP-Wirkung darin, die Wasserpermeabilität des medullären Sammelrohres zu erhöhen. Bei Vögeln hingegen weist AVT sowohl tubuläre als auch vaskuläre Wirkungen in der Niere auf. Dieser duale Wirkungsmechanismus des antidiuretischen Hormons in der Vogelniere wurde von Burgess und Mitarbeitern [1933] entdeckt, die sowohl die tubuläre als auch die glomeruläre Antidiurese bei Hühnern nach systemischer Injektion von HHL-Extrakten beschrieben. In nachfolgenden Studien wurden die neurohypophysären Grundlagen genutzt, um den Mechanismus der AVT-induzierten Antidiurese an der Vogelniere zu untersuchen. Hierbei erfolgte bei exogener Verabreichung von AVT eine Nachahmung der renalen antidiuretischen Antwort auf Dehydratation oder Salzbelastung, welche als erste bei Hühnern, Wellensittichen (*Melopsittacus undulatus*), Stockenten und Wachteln beobachtet wurde [Bentley, 1974; Dantzler, 1978, 1980a, b; Dantzler und Braun 1980; Skadhauge, 1981]. Die klassische Wirkung des antidiuretischen Hormons, die Wasserpermeabilität der Sammelrohre zu erhöhen, wurde von Skadhauge [Skadhauge, 1963, 1964] am Beispiel des Huhnes aufgezeigt. Die finale tubuläre Reabsorption des glomerulär filtrierte Wassers schwankt abhängig vom Hydratationsstatus des Tieres zwischen 70 und nahezu 99 % [Goldstein, 2006]. Dabei führten schon marginale Zunahmen der AVT-Plasmakonzentration zu signifikanten antidiuretischen Antworten der Nieren von Huhn und Stockente, ohne z.B. die Nierendurchblutung bzw. die GFR zu beeinflussen [Stallone und Braun, 1985; Gerstberger *et al.*, 1994, 1997]. In *in vitro* Studien an isolierten medullären Sammelrohrabschnitten der Wachtelniere konnte zudem nachgewiesen werden, dass AVT in allerdings sehr hoher Konzentration zu einer Erhöhung der diffusionalen Permeabilität dieser Tubulusfragmente für Wasser führte [Nishimura *et al.*, 1996]. In einem komplexen mathematischen Modell wurde letztlich ermittelt, dass AVT-induzierte Änderungen der Wasserpermeabilität am Sammelrohr tatsächlich das Ergebnis der Urin-konzentrierung zu beeinflussen vermögen [Layton *et al.*, 2000].

Eine wesentliche Wirkung des AVT auf die Vogelniere könnte zusätzlich in der Reduktion der glomerulären Filtration als Bestandteil der renalen Antwort des Vogels auf Dehydratation des EZF Kompartimentes liegen [Ames *et al.*, 1971; Gerstberger *et al.*, 1985]. Eine

verminderte GFR wird dabei durch AVT-induzierte Konstriktion der afferenten, präglomerulären Arteriolen herbeigeführt [Braun und Dantzer, 1974; Goecke und Goldstein, 1997]. Detaillierte Studien an der Wachtel ergaben bei Anwendung der [ $^{14}\text{C}$ ]Ferrocyanid-Methode eine dosisabhängige Reduktion der Gesamt-GFR beider Nieren während systemischer AVT-Applikation in hohen Konzentrationen, wobei die Isolation einzelner Nephronen *post-mortem* in erster Linie eine markante Einschränkung der Filtration der RT-Glomerula ohne ausgeprägte Henleschleife induzierte [Braun und Dantzer, 1972, 1974]. Vergleichende Untersuchungen am Huhn konnten ebenfalls eine Abnahme der Gesamt-GFR mit steigender Plasmakonzentration an AVT nachweisen; der bei weitem größere Anteil der AVT-induzierten Antidiurese bei physiologisch relevanten AVT-Konzentrationen im Plasma wurde jedoch tubulären Mechanismen mit nicht näher definierter renaler Lokalisation zugeschrieben [Stallone und Braun, 1985]. Auch bei der Stockente führte lediglich eine Bolusapplikation von AVT in höherer Konzentration zu einer Verringerung der GFR [Gerstberger *et al.*, 1985]. Mit einem pharmakologischen Versuchsansatz konnten Goecke und Goldstein [1997] andererseits bei Spatzen nachweisen, dass unter Blockade möglicherweise  $V_1$ -analoger, vaskulärer Rezeptorproteine für AVT die durch Vasotocin hervorgerufene Antidiurese aufgehoben werden konnte, wodurch die Beteiligung einer reduzierten GFR bei der Antidiurese zu fordern wäre.

### **1.3.3.3. AVT-spezifische Rezeptorproteine**

Alle bis *dato* klonierten Rezeptorproteine für neurohypophysäre Hormone bei Vertebraten - vom Fisch bis zum Säuger - sind Mitglieder der großen G-Protein gekoppelten Rezeptorfamilie mit sieben hydrophoben, membrandurchspannenden  $\alpha$ -Helices, einem cytoplasmatischen C- und einem extrazellulären N-Terminus [Barberis *et al.*, 1998]. Mehrere Rezeptorsubtypen für AVP bzw. Oxytocin wurden bei Säugetieren aufgrund unterschiedlicher Zielstrukturen, intrazellulärer second messenger und zellulärer Wirkmechanismen definiert. Die AVP-spezifische, physiologische Wirkung wird jeweils über den  $V_{1a}$ -,  $V_{1b}$ - und  $V_2$ -Rezeptorsubtyp vermittelt [Birnbaumer, 2000].

#### **1.3.3.3.1. Die $V_{1a}$ - und $V_{1b}$ -Rezeptorsubtypen des Säugers**

$V_{1a}$ -Rezeptoren sind in den glatten Muskelzellen der Blutgefäße lokalisiert, wo es intrazellulär vermittelt durch Bildung von Inositoltrisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) und erhöhtes Calcium

- zu einer arteriolen Vasokonstriktion kommt, sowie in den Hepatocyten der Leber, in welchen AVP, wiederum  $IP_3$ -vermittelt, die Glycogenolyse induziert. Den  $V_{1a}$ -Rezeptor-subtyp findet man darüber hinaus in Gehirn [Gerstberger und Fahrenholz, 1989; Landgraf *et al.*, 1995] sowie in der Niere, wobei in letzterer die  $V_{1a}$ -Rezeptor Expression für den Bereich der corticalen und medullären Sammelrohre, aber auch die Glomerula, den Bereich der proximalen Tubuli sowie die *Aa. arcuatae* gezeigt werden konnte [Gerstberger und Fahrenholz, 1989; Terada und Marumo, 1993]. Ostrowski und Mitarbeiter [1993] beschreiben eine signifikante Lokalisation für  $V_{1a}$ -Rezeptoren vor allem in medullär-vaskulären Elementen sowie kurzen Segmenten der corticalen, distalen Tubuli. Der  $V_{1b}$ -Rezeptor-subtyp wird im Uterus, in olfaktorischen, limbischen sowie hypothalamischen Strukturen des Gehirns, sowie vor allem in corticotrophen Zellen der Adenohypophyse exprimiert, wo AVP an der Freisetzung von ACTH beteiligt ist [Hernando *et al.*, 2001]. Die Aminosäuresequenz des hepatischen  $V_{1a}$ -Rezeptors wurde erstmals durch Morel und Mitarbeiter [1992], diejenige des humanen  $V_{1b}$ -Rezeptors durch Sugimoto und Mitarbeiter [1994] mittels molekularer Klonierungsstrategien dechiffriert.

### ***1.3.3.3.2. Der renale $V_2$ -Rezeptor-subtyp des Säugers; cAMP als second messenger***

Von herausragender Bedeutung für die Homöostase des Salz- und Wasserhaushalts dagegen ist der  $V_2$ -Rezeptor-subtyp für AVP, welcher vornehmlich in der basolateralen Membran epithelialer Zellen des Sammelrohrbereichs des äußeren wie inneren Marks sowie des dicken, aufsteigenden Teils der Henleschen Schleife (TALHS) exprimiert wird [Ostrowski *et al.*, 1993; Terada *et al.*, 1993; Bankir, 2001]. Immunhistochemisch konnte der  $V_2$ -Rezeptor im distalen Tubulus, *pars convoluta*, sowie im gesamten Sammelrohrbereich, nicht jedoch innerhalb der TALHS nachgewiesen werden [Fenton *et al.*, 2007]. Dabei erhöht AVP über den gesamten Bereich der Sammelrohre die Permeabilität der apikalen Membran für Wasser durch den Einbau von Wasserkanälen (Kap. 1.4.4); in terminalen medullären Sammelrohren kann vermehrt Harnstoff ins Interstitium austreten. Darüber hinaus erfolgt eine AVP-induzierte Retention von Natrium über epitheliale Natriumkanäle in corticalen und äußeren medullären Sammelrohren, sowie ebenfalls  $V_2$ -Rezeptor-vermittelt in der TALHS einiger Nager [Bankir, 2001]. Der  $V_2$ -Rezeptor wurde zu Beginn der 90er Jahre nahezu zeitgleich für die Rattenniere [Lolait *et al.*, 1992], die Niere des Menschen [Birnbaumer *et al.*, 1992] sowie für eine porcine Nierenzelllinie

[Gorbulev *et al.*, 1993] kloniert. Die Anwendung der Fluoreszenz-Mikrophotolyse erbrachte den interessanten Nachweis der lokalen  $V_2$ -Rezeptor Aggregation sowie einer hohen lateralen Mobilität in der Plasmamembran einer epithelialen Nierenzelllinie des Schweines [Jans *et al.*, 1989].

Der renale  $V_2$ -Rezeptor zählt zu den am besten charakterisierten Peptidrezeptoren und vermittelt seine Signale vor allem durch die G-Protein induzierte, intrazelluläre Bildung von cAMP als *second messenger* [Laycock und Hanoune, 1998; Birnbaumer, 2000; Bankir, 2001]. Pharmakokinetische Untersuchungen an isolierten terminalen, medullären Sammelrohren der Rattenniere wiesen auf eine dosisabhängige cAMP-Bildung mit  $K_m$ -Werten im Bereich von  $3 - 5 \times 10^{-10}$  M/L AVP hin, parallel einhergehend mit einer erhöhten Permeabilität der Sammelrohre für Wasser und Harnstoff [Star *et al.*, 1988]. In Primärkulturen desselben Nephronsegmentes bewirkte die Superfusion mit AVP einen markanten Anstieg der intrazellulären cAMP-Bildung mit einem  $EC_{50}$ -Wert von  $7 \times 10^{-10}$  M/L [Yasuda und Jeffries, 1998].

### **1.3.3.3. AVT-Rezeptoren bei Vögeln**

Die Charakterisierung analoger, AVT-spezifischer Rezeptorproteine bei Vögeln, Reptilien, Amphibien oder Fischen hat in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht, und es konnten mehrere  $V_1$ - und  $V_2$ -ähnliche Rezeptoren kloniert und ihre Struktur sekundär abgeleitet werden [Cornett *et al.*, 2003; Baeyens und Cornett, 2006]. Dabei blieben jedoch noch zahlreiche Fragen hinsichtlich ihrer physiologischen Bedeutung sowie intrazellulären Signaltransduktion offen [Goldstein, 2006; Nishimura *et al.*, 2007]. In der Klasse der Vögel (*Aves*) erfolgte bis *dato* die Sequenzierung zweier Vasotocin-Rezeptoren sowie eines Oxytocin-ähnlichen Rezeptors. Sequenzvergleiche deuten darauf hin, dass die extrazellulären loops II und III, sowie hochkonservierte Sequenzen der zweiten transmembranalen Domäne (TM-2) jeweils an der Ligandenbindung beteiligt sein könnten [Baeyens und Cornett, 2006].

Als erstes wurde ein Vasotocin-1-Rezeptor ( $VT_1R$ ) des Huhnes kloniert und in einem *ribonuclease protection assay* konnte seine Expression im Gehirn sowie der Schilddrüse, nicht jedoch Leber und Niere des Huhnes nachgewiesen werden [Tan *et al.*, 2000]. Dabei

ist die VT<sub>1</sub>R-Expression in der Schilddrüse auf das Endometrium beschränkt, so dass sich die AVT-induzierte Uteruskontraktion lediglich auf parakrine Mechanismen, etwa die durch AVT stimulierte lokale Bildung von Prostaglandinen zurückführen ließe [Baeyens und Cornett, 2006]. Ein weiteres, als Vasotocin-2-Rezeptor (VT<sub>2</sub>R) bezeichnetes Protein mit hoher Sequenzhomologie zum hypophysären V<sub>1b</sub>-Rezeptor der Säugetiere konnte molekularbiologisch charakterisiert und mit hoher Expressionsrate in der aviären Adenohypophyse, nicht jedoch peripheren Organen wie etwa der Niere nachgewiesen werden [Cornett *et al.*, 2003; Jurkevich *et al.*, 2005]. In Primärkulturen des Hypophysenvorderlappens des Huhnes stimulierte AVT die Freisetzung von ACTH [Baeyens und Cornett, 2006]. Sowohl VT<sub>1</sub>R als auch VT<sub>2</sub>R führen nach Aktivierung durch AVT in transfizierten COS7 Zellen zu einem gesteigerten *turnover* des Phosphoinositols sowie Erhöhung der intrazellulären Calcium-, nicht jedoch cAMP Konzentration [Tan *et al.*, 2004; Jurkevich *et al.*, 2005]. Ein dem renalen V<sub>2</sub>-Rezeptor der Säuger homologer AVT-Rezeptor bei Vögeln konnte überraschenderweise bis *dato* nicht in seiner Sequenz bestimmt werden, und auch bezüglich des *second messenger* cAMP existiert eine konträre Diskussion [Baeyens und Cornett, 2006].

Rezeptor	Hypophyse	Gehirn	Leber	Gefäße	Niere	Uterus
Säugetierspezifischer V1A-Rezeptor	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	
Säugetierspezifischer V1B-Rezeptor	Ja	Ja	Nein	Nein	Ja	Ja
Säugetierspezifischer V2-Rezeptor	Nein	Nein	Nein	Nein	Ja	
Vogelspezifischer VT1-Rezeptor		Ja	Nein	Nein	Nein	Ja
Vogelspezifischer VT2-Rezeptor	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein

**Tab. 1 :** Expression AVP- und AVT-spezifischer Nonapeptidrezeptoren.

Gewebespezifische Expression verschiedener Subtypen des AVP- bzw. AVT-Rezeptors in Geweben von Säugetieren und Vögeln (aus : Goldstein [2006]).

Die Expression eines dem V<sub>2</sub>-Rezeptor der Säugerniere analogen AVT-Rezeptorsubtyps in der Niere der Stockente bleibt aufgrund ganztierphysiologischer Studien umstritten [Gerstberger *et al.*, 1994; Gerstberger, 1997]. So bedingte AVT unter experimentellen Gleichgewichtsbedingungen einer konstanten Diurese schon in einer Konzentration von

0,5 pmol/min/kg KG eine transiente, maximale Antidiurese; der  $V_2$ -Agonist dDAVP erst in einer 20-fach höheren Konzentration eine halbmaximale Antidiurese. Die durch AVT induzierte Antidiurese blieb darüber hinaus bei gleichzeitiger pharmakologischer Blockade  $V_2$ -ähnlicher Rezeptoren durch spezifische  $V_2$ -Antagonisten selbst bei 200-fachem Konzentrationsüberschuss unverändert. Kompetitive Verdrängungsstudien mit einer angereicherten Plasmamembran-Fraktion aus der Entenniere und [ $^3\text{H}$ ]AVP als Radioliganden ergaben hohe Affinitäten für AVT mit  $K_i$ -Werten von  $2 \times 10^{-9}$  M/L, jedoch lediglich  $5 \times 10^{-5}$  M/L für den klassischen  $V_2$ -Agonist dDAVP und  $>10^{-4}$  M/L für zahlreiche  $V_{1a}$ - bzw.  $V_2$ -spezifische Antagonisten [Gerstberger *et al.*, 1994; Gerstberger, 1997].

Die mögliche renale Induktion der cAMP Bildung durch AVTerge Stimulation wurde für mehrere Vogelspezies getestet. In frühen Experimenten an Nierenexplantaten von Taube und Huhn konnte zwar nach Stimulation mit Parathormon, nicht jedoch AVT eine induzierte cAMP Bildung gezeigt werden [Dousa, 1974]. An isolierten Segmenten der Vogelniere, wie dem aufsteigenden Ast der Henleschleife oder corticalen bzw. medullären Sammelrohren, vermochte AVT erst in eindeutig supraphysiologischer Konzentration ( $10^{-7}$  -  $10^{-5}$  M/L) die intrazellulären cAMP Spiegel um das vierfache beim Legehuhn [Stallone *et al.*, 1994], das dreifache beim Hausspatz [Goldstein, 2006] und das 2 - 5 fache bei der Japanischen Wachtel [Nishimura *et al.*, 1996] zu stimulieren. In jedem Fall bedingte die maximale Aktivierung der Adenylatcyclase (AC) durch Forskolin als generellem AC-Induktor eine Steigerung ihrer Grundaktivität um je nach Spezies das 15 - 100 fache und damit wesentlich höher als durch AVT auch nur annähernd erreichbar.

Sowohl die molekularbiologischen Grundlagen des aviären  $V_2$ -Rezeptoranalogs für die Niere als auch die Bedeutung von cAMP als wichtigem *second messenger* in der Vogelniere stellen wichtige Themen künftiger Forschung an der Vogelniere im Rahmen der Körperflüssigkeitshomöostase dar.

### **1.4. Aquaporine**

Nach der Entdeckung der Lipiddoppelschicht als Grundlage der Plasmamembranen tierischer Zellen in den 20er Jahren des letzten Jahrhunderts ging man von einer einfachen Diffusion der Wassermoleküle mit Dipolcharakter durch die Zellmembran aus. Die Durch-

lässigkeit der Zellmembran für Wasser *per diffusionem* ist limitiert, wenngleich an künstlichen Lipiddoppelschichten eine für Wasser - im Vergleich etwa zu Elektrolyten ( $p = 10^{-12}$  bis  $10^{-10}$  cm/sec) - relativ hohe Permeabilität von  $3 \times 10^{-2}$  cm/sec ermittelt werden konnte [Dudel *et al.*, 1997]. Darüber hinaus weisen apikale bzw. basolaterale Zellmembranen verschiedener, transportaktiver Epithelien stark unterschiedliche Permeabilitäten für Wasser auf, was durch die reine bzw. osmotisch induzierte Diffusion nicht erklärt werden kann. In den 70er Jahren wurde aufgrund biophysikalischer Modelle und elektronenmikroskopischer Untersuchungen die Existenz von spezifischen Wasserkanälen postuliert [Chevalier *et al.*, 1974; Brown *et al.*, 1983; Kirk und Schäfer, 1992]. Anfang der 90er Jahre gelang es schließlich, ein aus Versuchen an Rhesus-Blutgruppenantigenen bekanntes Protein mit bis dahin unbekannter Funktion als den gesuchten Wasserkanal in Erythrozyten (CHIP28, *channel-forming integral protein*) sowie tubulären Segmenten der Niere zu identifizieren [Preston *et al.*, 1992; Agre, 2006]. Später wurde dieses Protein Aquaporin-1 genannt.

Aquaporine (AQP) repräsentieren eine Familie kleiner, hydrophober, membranintrinsischer Proteine, welche als Wasserkanäle fungieren und einen schnellen und selektiven, transmembranalen Transfer von Wassermolekülen ermöglichen. Es handelt sich um phylogenetisch konservierte Proteine, welche für mikrobielle Organismen, Pilze, Insekten, alle Vertebratengruppen und sogar Pflanzen nachgewiesen werden konnten [Chrispeels und Agre, 1994; Borgnia *et al.*, 1999]. Im Jahr 2003 erhielt Peter Agre für seine Forschungen auf dem Gebiet der Aquaporine den Nobelpreis für Chemie. Mittlerweile sind 13 verschiedene AQPs bei Säugetieren bekannt (AQP-0 bis AQP-12), von welchen AQP-0, -1, -2, -4, -5, -6 und -8 nur für Wasser permeabel sind, während AQP-3, -7, -9 und -10 außer Wasser auch Glycerin, Harnstoff sowie möglicherweise einige andere gelöste Biomoleküle zu transportieren vermögen und daher als Aquaglyceroporine bezeichnet werden [Yamamoto und Sasaki, 1998; Agre, 2006; Hara-Chikuma und Verkman, 2006; Kondo *et al.*, 2006].

### ***1.4.1. Klassifizierung der renal exprimierten Aquaporine***

Vor allem lecke epitheliale Gewebe mit ausgeprägter Permeabilität für Wasser exprimieren wasserselektive Kanäle. Mittlerweile ist bekannt, dass AQP-1, -2, -3, -4, -6 und -7 u.a. in der Säugetierniere exprimiert werden, wobei AQP-2, -3 und -4 im Bereich der renalen

Sammelrohre lokalisiert sind. Während AQP-2 (und möglicherweise AQP-6) induzierbar ist, erweisen sich AQP-1, -3 und -4 als konstitutiv exprimiert [Yamamoto und Sasaki, 1998; King *et al.*, 2000; Verkman und Mitra, 2000].

AQP-1 ist ein Quecksilber-sensibles, kanalformendes integrales Protein (CHIP28) mit einem Molekulargewicht von 28 kDa [Preston und Agre, 1991], bei renaler Expression in der apikalen und basolateralen Plasmamembran epithelialer Zellen des PT und des dünnen absteigenden Astes der HS, übereinstimmend mit der funktionellen Rolle der transzellulären Wasserreabsorption im proximalen Nephron bei Säugern, sowie den absteigenden *Vasa recta* [Nielsen *et al.*, 1993b, c]. AQP-1 knockout Mäuse weisen Defizite im renalen Konzentrationsmechanismus auf [Ma *et al.*, 1998]. Durch auf RT-PCR basierende Techniken konnte auch aus Nierengewebe von Wachtel [Yang *et al.*, 2004], Kolibri (*Trochilida*) [Powers *et al.*, 2002], Hausspatz [Casotti *et al.*, 2007] und Huhn [Sugiura *et al.*, 2008] ein AQP-1 homologer Wasserkanal kloniert bzw. mittels spezifischer Primer-Paare nachgewiesen werden, mit teilweise aufgezeigter Expression im Bereich des PT sowie des medullären Markkegels. Bei Säugern ließ sich AQP-1 außerdem in Harnblase, Auge, Respirationstrakt und Gehirn nachweisen. So wird AQP-1 im *Plexus chorioideus* des lateralen Hirnventrikels exprimiert und ist möglicherweise an der Bildung des *Liquor cerebrospinalis* (CSF) beteiligt [Nielsen *et al.*, 1993b]. AQP-1 Null-Mäuse zeigten eine gestörte CSF-Bildung im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen [Oshio *et al.*, 2003].

AQP-2 wurde erstmals aus renalem Gewebe des Sammelrohrbereichs der Ratte, später zahlreicher Säugerspezies kloniert [Fushimi *et al.*, 1993; Yamamoto und Sasaki, 1998]. Die AQP-2-spezifische Region der AS-Sequenz 198 - 205 ist identisch für Ratte, Mensch, Maus und Schaf, jedoch signifikant unterschiedlich zur analogen Sequenz anderer renaler Aquaporine. AQP-2 wird selektiv in den Verbindungstubuli [Kishore *et al.*, 1996] sowie der (sub-) apikalen Region der Hauptzellen im Bereich der Sammelrohre exprimiert [Nielsen *et al.*, 1993a; Fushimi *et al.*, 1994]. In inaktiver Form liegt AQP-2 zytoplasmatisch vesikulär vor [Nielsen *et al.*, 1993a], und wird durch zirkulierendes AVP nach V<sub>2</sub>-Rezeptor Aktivierung durch Translokation von den subapikalen Endosomen zur apikalen Plasmamembran transloziert [Brown, 2003] (Kap. 1.4.4). Ein AQP-2 homologer Wasserkanal wurde auch aus medullären Markkegeln der Wachtelniere kloniert [Nishimura,

2008], dessen immunhistochemisch aufgezeigte Expression in corticalen und medullären Sammelrohren sich zudem nach AVT-Behandlung *in vivo* als erhöht erwies [Yang *et al.* 2004]. Eine partielle Aminosäuresequenz konnte auch für huhnspezifisches AQP-2 identifiziert und mittels Northern-Analyse ausschließlich als in den Nieren exprimiert charakterisiert werden [Ramirez-Lorca *et al.*, 2006]. Wasserdeprivation bzw. exogene Salzbelastung *in vivo* führte zu einer signifikant erhöhten Expression von AQP-2 in der Hühnerniere [Sugiura *et al.*, 2008].

AQP-3 zeigt eine geringe Permeabilität für Harnstoff und Glycerol in Verbindung mit Wasser. Die Expression erfolgt konstitutiv in der basolateralen Membran der corticalen und medullären Sammelrohre, ohne vesikuläre Translokation, sowie Epithelzellen des Gastrointestinaltrakts und der Trachea [Echevarria *et al.*, 1994]. Langfristiger Trinkwasserentzug bedingte einen geringfügigen Anstieg der AQP-3 spezifischen mRNA bei der Ratte [Yamamoto und Sasaki, 1998].

AQP-4 wird in Niere, Gehirn, Auge und Lungengewebe bei Säugern exprimiert. Dieser Wasserkanal findet sich in der Niere kolokalisiert mit AQP-3 in der basolateralen Membran epithelialer, medullärer Sammelrohrzellen, scheint aber nicht am Konzentrationsprozess des Harns beteiligt zu sein, wie Studien an knockout Mäusen belegen [Verkman und Mitra, 2000]. Bei der Wachtel konnte lediglich die Expression einer von zwei AQP-4 spezifischen mRNAs (bzw. cDNAs) für die gesamte Niere detektiert werden, ohne Einblicke in deren funktionelle Bedeutung gewinnen zu können [Yang *et al.*, 2007; Nishiura, 2008]. Auch die Insertion von wachtelspezifischen AQP-4 in die Oozytenmembran von *Xenopus* führte nicht zu markanten Volumenänderungen der Oozyte im hypotonen Milieu, ganz im Unterschied zu inseriertem human- bzw. rattenspezifischen AQP-4 [Yang *et al.*, 2007]. In der Hühnerniere mit nachweislich schwacher AQP-4 Expression hatte Dehydratation bzw. Salzbelastung *in vivo* keinen oder nur leicht supprimierenden Einfluss auf die molekular-biologisch nachgewiesene mRNA-Menge für diesen Wasserkanal [Saito *et al.*, 2005; Sugiura *et al.*, 2008], so dass die physiologische Bedeutung des renalen AQP-4 bei Säuger und Vögeln als noch nicht geklärt angesehen werden muss.

Dafür stellt AQP-4 bei einigen Säugern sowie Huhn und Wachtel den vorherrschenden Wasserkanal im Zentralnervensystem dar [Saito *et al.*, 2005; Goren *et al.*, 2006; Ramirez-Lorca *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007]. Der transmembranale, zerebrale Wassertransport spielt u.a. bei der Liquorproduktion und -absorption, im Rahmen der Blut-Hirn Schranken Funktion sowie bei der Regulation des Zellvolumens eine herausragende Rolle. Dabei scheint AQP-4 konstitutiv exprimiert zu sein, und Wasserrestriktion führte nicht zu einer veränderten AQP-4-Expression. So ist AQP-4 zumindest bei Säugern für die astrozytäre Volumenkontrolle von entscheidender Bedeutung und verhindert auf diese Weise pathologische Veränderungen, wie z.B. Ödembildung im ZNS [Yool, 2007].

AQP-5 spielt eine Rolle in der Flüssigkeitssekretion in exokrinen Geweben wie etwa den Speicheldrüsen der Ratte, den Tränendrüsen des Menschen [Agre, 2006] oder den supra-orbitalen Salzdrüsen mariner Vögel [Müller *et al.*, 2006].

AQP-6 wurde als intrazellulärer Wasserkanal von Ratten- und Menschennieren isoliert [King *et al.*, 2000]. Seine Gensequenz ist ähnlich dem des AQP-2, so dass vermutet wird, dass sie evolutionär nah verwandt sind. Der AQP-6 Wasserkanal wird in den Vesikeln der Epithelzellen des proximalen Tubulus und in den interkalierten Zellen der Sammelrohre exprimiert, bei relativ geringer Permeabilität für Wasser. Als mögliche Rolle für AQP-6 wird eine Regulation der Anionen-Permeabilität und des Säure-Basen-Gleichgewichtes vermutet [Yasui *et al.*, 1999a, b].

AQP-7 gehört zu den Aquaglyceroporinen und wird in Ovar, Hoden, Herz, Fettgewebe und dem Bürstensaum des PT exprimiert. Im PT bedingt AQP-7 vermutlich den transzellulären Wassertransport zusammen mit AQP-1 [Ishibashi *et al.*, 2000]. Alternativ transportiert AQP-7 sowohl Wasser als auch Harnstoff, wobei AQP-7 eine Funktion im passiven Harnstoff-sekretorischen Stoffwechselweg sowie eine mögliche Bildung und/oder Aufrechterhaltung des medullären Harnstoff-Konzentrationsgradienten zugesprochen wird.

AQP-8 ist verantwortlich für die Sekretion der Pankreasflüssigkeit [Dibas *et al.*, 1998].

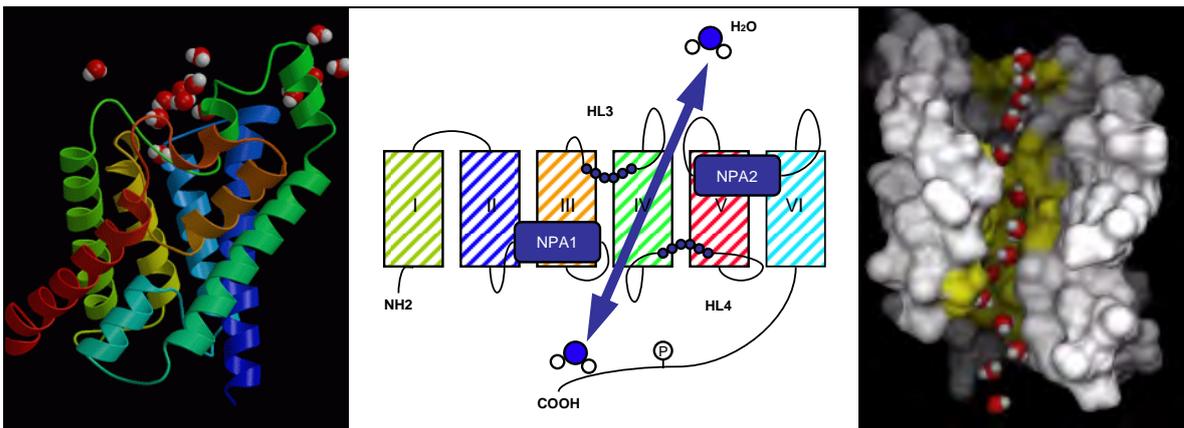
AQP-9 gehört zu den Aquaglyceroporinen und läßt sich in Astrozytenausläufern und Zellkörpern nachweisen [Tsukaguchi *et al.*, 1998] und in Folge einer transienten, lokalen Gehirnschämie hochregulieren [Badaut *et al.*, 2002]. Die genaue Funktion ist jedoch unklar, eine Beteiligung am Energiemetabolismus im Gehirn wird diskutiert [Amiry-Moghaddam und Ottersen, 2003].

### ***1.4.2. Molekulare Struktur des Aquaporin-2 (AQP-2)***

Auf molekularer Ebene ist AQP-1 als zuerst identifizierter und charakterisierter Wasserkanal, sowie die meisten anderen AQPs auch, in der Plasmamembran als Tetramer angeordnet [Denker *et al.*, 1988; Verbavatz *et al.*, 1993], wobei jedes Monomer funktionell unabhängig ist, was zu der Annahme führte, dass jedes der Monomere eine Wasserpore umspannt [Preston *et al.*, 1993; Shi *et al.*, 1994; Tait *et al.*, 2008]. Bezüglich der AQP-1 Struktur wurden drei mögliche Modelle diskutiert: das Sanduhr-Modell [Jung *et al.*, 1994b], das  $\alpha$ -helikale Modell [Skach *et al.*, 1994] und das  $\beta$ -Tonnen-Modell [Fischbarg *et al.*, 1995]. Dem Sanduhr-Modell entsprechend wird der Wasserkanal durch zwei Domänen mit hochkonservierten NPA-Boxen, welche eine Asparagin-Prolin-Alanin Sequenz darstellen, geformt. Gemäß des  $\alpha$ -helikalen Modelles ist der Wasserkanal zwischen transmembranären Segmenten mit  $\alpha$ -helikaler Anordnung lokalisiert. Im  $\beta$ -Tonnen-Modell wird der Wasserkanal aus ungefähr 16 antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern, analog zu dem Porin-Kanal der Bakterienspezies, gebildet [Cowan *et al.*, 1992].

Membrantopologische Studien zeigten, dass sich AQP-2 in der Plasmamembran aus sechs membrandurchspannenden  $\alpha$ -helikalen Domänen mit zytoplasmatisch orientierten Amino- und Carboxyterminalen zusammensetzt [Bai *et al.*, 1996] (Abb. 7). Diese sechstransmembranäre Topologie, die quecksilbersensiblen Positionen des AQP-2, sowie die Phosphorylierung seines COOH-Terminus entsprechen dem Sanduhr-Modell des AQP-1 [Jung *et al.*, 1994b; Kuwahara *et al.*, 1995]. Durch N-Glykosylierung und Immunoblots wurde die extrazelluläre Lokalisation der hydrophilen Schleifen HL1, HL3 und HL5 bestätigt, wodurch sich das  $\alpha$ -helikale [Skach *et al.*, 1994] und das  $\beta$ -Tonnen-Modell [Fischbarg *et al.*, 1995] für die AQP-2 Struktur als inadäquat erwiesen. Insertionen bestimmter Aminosäurereste in HL2 und HL5 zeigten einen geringen Effekt bezüglich der Funktion des AQP-2, im Gegensatz zu AQP-1, wo es zur vollständigen Elimination seiner Funktion als

Wasserkanal führte [Preston *et al.*, 1994]. Die Beteiligung der Schleifen HL3 und HL4 an der Anordnung der Wasserpore wurde durch den Austausch dieser Domäne mit entsprechenden Teilen des *glycerol uptake facilitator protein* (GlpF) aus *Escherichia coli* offenbar. Da GlpF für Glycerin, nicht jedoch für Wasser permeabel ist, induziert rekombinantes HL3 und HL4 mit GlpF-Funktion keine Wasserpermeabilität. Im Gegensatz dazu beeinflussen Aminosäureaustauscher in der HL4-Region die osmotische Wasserpermeabilität. Eine Inhibition der osmotischen Wasserpermeabilität durch geringe Konzentrationen an Quecksilber (Hg) erwies sich als charakteristisch für Wasserkanäle. Es wird angenommen, dass Quecksilber mit Cysteinresten interagiert, welche in nearest neighbour Position zur Wasserpore gelegen sind [Jung *et al.*, 1994a]. Deshalb ist die Identifikation Hg-sensibler Cysteinreste für das Auffinden der Wasserpore essentiell. Die Ergebnisse zeigen, dass Cys-181 das quecksilbersensible Cystein des AQP-2 darstellt, analog der Bedeutung des Cys-189 für AQP-1.



**Abb. 7 :** Schematische Darstellung der vermutlichen Struktur des AQP-2 Wasserkanals.

Das AQP-2-Molekül besteht aus sechs transmembranären Domänen (Rechtecke I-VI), der hydrophilen Schleife drei (HL3), der Schleife vier (HL4) und zwei Asp-Pro-Ala (= NPA) -haltigen Domänen (NPA1 und NPA2). Die eigentliche Wasserpore und die Engstelle, die die selektive Wasserpermeabilität bestimmt werden durch die Anordnung der HL3 und der zweiten NPA-Domäne (NPA2) auf der extrazellulären Seite und durch die HL4 und die erste NPA-Domäne (NPA1) auf der intrazellulären Seite gebildet (modifiziert nach Bai *et al.* [1996]).

Die Struktur der Wasserpore und der Engstelle, welche die selektive Wasserpermeabilität bestimmt, besteht bei AQP-2 zum einen aus den extrazellulär gelegenen Schleifen HL3 und HL5 und zum anderen aus den intrazellulär gelegenen Schleifen HL2 und HL4, die

sich im Bereich der Wasserpore falten, eine Engstelle bilden und aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaften geladene Ionen und große Moleküle vom Porendurchtritt abhalten [Bai *et al.*, 1996]. Die Rolle der beiden hochkonservierten NPA-Boxen in den Schleifen HL2 und HL5 scheinen für die Bildung einer korrekten dreidimensionalen Struktur des AQP-2 notwendig zu sein.

### **1.4.3. Funktion und Bedeutung des AQP-2**

In der Säugerniere wird AQP-2 in erster Linie in medullären Epithelzellen des distalen Tubulus (*pars convoluta*) sowie der Sammelrohre in zytoplasmatischen Vesikeln sowie der apikalen Zellmembran exprimiert, wie durch *in situ* Hybridisierung [Ma *et al.*, 1994] und Immunhistochemie [Nielsen *et al.*, 1993a; Marples *et al.*, 1995; Shi *et al.*, 2007] gezeigt. Schon lange vor der Klonierung des ersten Wasserkanals AQP-1 [Preston *et al.*, 1992] sowie des renalen AQP-2 [Fushimi *et al.*, 1993] konnten für den Sammelrohrbereich der Säugerniere sowie die Amphibienhaut etwa nach Dehydratation des Versuchstieres bzw. systemischer Applikation des antidiuretischen Hormons (elektronen-) mikroskopische Veränderungen in der apikalen Membran der Epithelzellen beschrieben und analysiert werden [Kirk und Schäfer, 1992]. So konnten bei Gefrierbruchexperimenten in der Krötenhaut nach ADH-Behandlung „intramembranale Partikel (IMPs)“ in der apikalen Membran sowie tubulovesikuläre Fusionsstrukturen mit der Membran demonstriert werden [Müller *et al.*, 1980; Hays *et al.*, 1985]. Interferenzkontrastmikroskopie ermöglichte den Nachweis intrazellulärer Vakuolenbildung in Epithelzellen intakter Sammelrohre der Kaninchenniere nach ADH-Stimulation [Kirk, 1988].

Die Funktion des AQP-2 beruht auf einer hoch effizienten und gleichzeitig selektiven Leitfähigkeit für Wassermoleküle (Abb. 7) mit Transportraten von bis zu  $3 \times 10^9$  Wassermolekülen pro Sekunde und Kanalprotein. So passieren einerseits Wassermoleküle den Kanal, andererseits werden z.B. Ionen am Durchtritt gehindert. Für AQP-1 ist bekannt, dass bei einer äußeren Weite des Kanals von etwa 20 Ångstrom und lediglich 2,8 Ångstrom an seiner engsten Stelle die Wasserdipole das Lumen „in Schlange“ passieren [Agre, 2005]. Humanes AQP-2 konnte kürzlich erstmals kristallisiert und elektronenkristallographisch sowie durch *atomic force* Mikroskopie bei einer Auflösung von 4,5 Å und ohne detaillierte Aussagen über die eigentliche Pore analysiert werden [Schenk *et al.*, 2005]. Aufgrund der Tatsache, dass Wasser selbst ein guter Protonenleiter ist (Protonenleitung

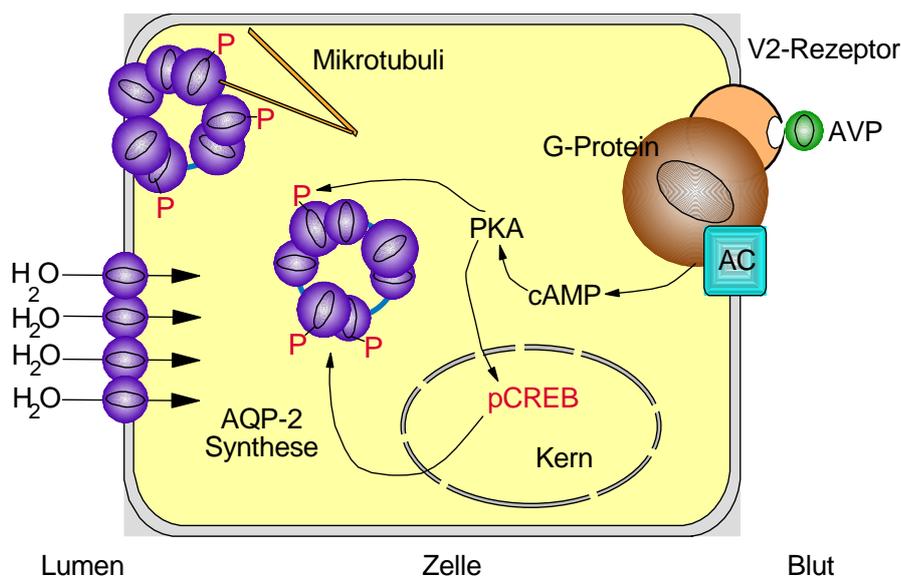
über Wasserstoffbrückenbindungen), stellte sich die Frage, wie AQP-2 den Durchfluss kleiner Ionen wie etwa Protonen verhindert. Mittels Computersimulation und dadurch ermöglichter Darstellung von Bewegungsabläufen einzelner Wassermoleküle vom AQP-1 Typ konnte veranschaulicht werden, dass im Zentrum dieses Kanals H<sub>2</sub>O kurzfristig Wasserstoffbrücken mit zwei Asparagin-Resten des Proteins ausbildet, wodurch anscheinend der Durchtritt von Protonen limitiert wird [Agre, 2005].

### ***1.4.4. AVP-induzierte de novo Synthese und Translokation von AQP-2***

Wie schon angedeutet, handelt es sich bei AQP-2 des Säugers offensichtlich um einen durch AVP (= Vasopressin = ADH) induzierten Wasserkanal mit Lokalisation vornehmlich in der apikalen Membran der Sammelrohrzellen. In biophysikalischen Messungen, durchgeführt *in vitro* an isolierten corticalen Sammelrohren des Kaninchens, konnte sowohl die diffusionale als auch osmotische Permeabilität - ausgehend von Basalwerten von 9 respektive 56  $\mu\text{m}/\text{sec}$  - in Gegenwart von AVP auf das drei- respektive neunfache erhöht werden [Kirk und Schäfer, 1992]. Weitere Studien an perfundierten medullären Sammelrohren der Rattenniere deuteten an, dass Änderungen der AQP-2 Konzentration in der apikalen Plasmamembran linear mit der Permeabilität des Tubulus für Wasser korrelierten [Nielsen *et al.*, 1995a]. *In vivo* Untersuchungen an normalen und genetisch AVP-defizienten Brattleboro-Ratten zeigten einen deutlichen Anstieg an immunreaktivem AQP-2 in der apikalen Membran als Reaktion auf AVP oder den V<sub>2</sub>-Agonisten dDAVP und sicherten somit den kausalen Zusammenhang zwischen erhöhten Plasmaspiegeln an AVP, vermehrten „Einbau“ von AQP-2 in die luminale Membran der SR-Epithelzellen und der nachfolgenden renalen Wasserretention [Marples *et al.*, 1995; Sabolic *et al.*, 1995; Yamamoto *et al.*, 1995].

Die Zunahme der transmembranalen Permeabilität für Wasser, *per diffusionem* und auch osmotisch getrieben, beruht einerseits auf der Zunahme an apikal exponierten AQP-2 Proteinen durch AVP-Aktivierung der Sammelrohrzellen, andererseits auf der offensichtlich vermehrten *de novo* Synthese von AQP-2 Wasserkanälen [Brown, 2003]. Western blot Analysen ergaben eine signifikante Aufregulation an *de novo* synthetisiertem AQP-2 nach Dehydrierung in Zellen des inneren Sammelrohrbereichs der Rattenniere [Nielsen *et al.*, 1993a; Marples *et al.*, 1995]. In porcinen Nierenzellen sowie immortalisierten Epithel-

zellen des murinen Sammelrohrbereichs führte AVP und auch membrangängiges 8-Bromo-cAMP zu einer vermehrten Expression an AQP-2 Proteinen sowie deren Translokation in die apikale Zellmembran [Yasui *et al.*, 1997; Hasler *et al.*, 2002]. Die Phosphorylierung des cAMP responsiven Element (CRE) Bindungsproteins (CREB) als bedeutendem, cAMP-abhängigen Transkriptionsfaktor deutete zusätzlich auf eine mögliche Aktivierung des Genes für AQP-2 durch AVP, sowie die Beteiligung von cAMP als *second messenger* hin [Yasui *et al.*, 1997]. So verursachte auf AQP-2 mRNA Ebene die intravenöse Applikation eines potenten V<sub>2</sub>-Rezeptor Antagonisten schon nach 30 min eine signifikante Reduktion der mRNA für AQP-2 im inneren Nierenmark von Ratten; andererseits hatte Wasserentzug für 48 Std. nahezu eine Verdreifachung des AQP-2 mRNA Signals zur Folge [Christensen *et al.*, 1998].



**Abb. 8 :** AVP-induzierte *de novo* Synthese und zelluläre Translokation von AQP-2. Zirkulierendes Vasopressin (AVP) bindet an den 7-transmembranalen, G-Protein gekoppelten V<sub>2</sub>-Rezeptor in der basalen Membran epithelialer Zellen des medullären Sammelrohres und führt durch Aktivierung der membranassoziierten Adenylatcyclase (AC) zur cAMP-Bildung, welches seinerseits die Proteinkinase A (PKA) aktiviert. PKA bedingt erstens die Phosphorylierung des cAMP responsive element binding protein (CREB), das als Transkriptionsfaktor im Zellkern zur AQP-2 spezifischen Genaktivierung und damit AQP-2 *de novo* Synthese führt. Zweitens vermag die PKA vesikulär gespeichertes AQP-2 zu phosphorylieren, wodurch es Aktin-bedingt zur Translokation der AQP-2 haltigen Vesikel an die apikale Zellmembran mit nachfolgender Insertion in diese kommt.

Nach Bindung von AVP an den renalen V<sub>2</sub>-Rezeptor in der basolateralen Membran der Hauptzellen kommt es also membran-assoziiert intrazellulär zur Bildung des klassischen sekundären Botenstoffes zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) mit nachfolgender Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) [Thibonnier *et al.*, 1998; Henn *et al.*, 2005]. Die enzymatische Aktivität der PKA bedingt eine Phosphorylierung membranvesikulär gespeicherter Wasserkanäle des Typs-2 (AQP-2) sowie die Insertion dieser präformierten Kanalproteine in die apikale Zellmembran von Hauptzellen der medullären Sammelrohre [Deen *et al.*, 2000; Noda und Sasaki, 2005]. Durch diese Translokation des intrazellulär „auf Abruf“ vesikulär gespeicherten AQP-2 aus dem Zytoplasma in die apikale Zellmembran erhöht sich die Permeabilität des ansonsten sehr dichten Epithels der Sammelrohre für Wasser um 1 - 2 Zehnerpotenzen, was letztendlich die Resorption von Wasser aus dem Sammelrohrbereich über das Interstitium in die Blutbahn ermöglicht. An mit AQP-2 transfizierten Zelllinien konnte durch wiederholte Stimulationen mit AVP bzw. 8-Bromo cAMP ein „Pendeln“ des AQP-2 von intrazellulär lokalisierten Vesikeln zur apikalen, in einigen Fällen auch zur basolateralen Membran, - das sogenannte „trafficking“ der Wasserkanäle -, registriert und detailliert analysiert werden [Katsura *et al.*, 1995, 1996, 1997; Deen *et al.*, 1997; Deen und Knoers, 1998]. Studien an primären epithelialen Zellkulturen des inneren Nierenmarks der Ratte konnten dabei nachweisen, dass erhöhtes intrazelluläres cAMP alleinig ausreichend dafür ist, die antidiuretische Zellantwort auf AVP-Perge Stimulation durch die Translokation der AQP-Wasserkanäle zu bewerkstelligen [Lorenz *et al.*, 2003; Henn *et al.*, 2005].

### ***1.4.5. Hintergründe und Fragestellung der wissenschaftlichen Arbeit***

Ziel dieses Versuchsvorhabens ist der grundlagenwissenschaftliche Erkenntnisgewinn bezüglich zellulärer Mechanismen einer, wenn auch seltenen, endokrinen Erkrankung des Geflügels. Die paarigen Nieren des Huhnes unterliegen hinsichtlich ihrer Ausscheidung und Rückresorption an Wasser und Elektrolyten einer komplexen hormonalen Kontrolle. Mit den Glomerula sowie distalen Abschnitten des tubulären Systems zweier unterschiedlicher Nephrontypen als wichtigsten Angriffspunkten, sind dabei vor allem das antidiuretische Hormon [Arg<sup>8</sup>]Vasotocin (AVT) des HHL, das Aldosteron (ALDO) der Nebennierenrinde sowie in Herz, Niere und Gehirn gebildete natriuretische Faktoren (ANP, BNP, CNP) von entscheidender Bedeutung. Dabei beeinflussen die drei genannten endokrinen Systeme

unterschiedliche zelluläre Vorgänge und bewirken letztendlich eine Diurese/Natriurese (ANP, BNP, CNP), eine Antinatriurese (ALDO) bzw. Antidiurese (AVT). Untersuchungen an Huhn und Ente deuten darauf hin, dass vor allem ANP/BNP/CNP einerseits und AVT andererseits dabei als Gegenspieler fungieren [Gerstberger *et al.*, 1985; Gray, 1993; Brenner und Gerstberger, 1999]. Bei der oben genannten Erkrankung handelt es sich um den *Diabetes insipidus* (DI, „Wasserruhr“) als angeborene oder erworbene Endokrinopathie, die in erster Linie durch eine vermehrte Urinausscheidung (Polyurie) und ein gesteigertes Durstgefühl mit vermehrtem Trinkverhalten (Polydipsie) charakterisiert ist. Beim aviären DI liegen gemäss tierphysiologischer Studien an Huhn und Wachtel in erster Linie Störungen der durch AVT vermittelten Antidiurese vor [Braun und Stallone, 1989; Wideman und Satnick, 1989]. Neben der klinischen Relevanz für die Humanmedizin [Robertson, 1995; Ball, 2007; Schrier, 2007] stellt der DI ein bekanntes Krankheitsbild bei Hund [Grünbaum und Moritz, 1991; Harb *et al.*, 1996], Pferd [Schott, *et al.*, 1993], Katze [Campbell und Bredhauer, 2005], Nagern [Kotnik *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2007] sowie Geflügel [Braun und Stallone, 1989; Brummermann und Braun, 1995; Minvielle *et al.*, 2007] dar.

Aufgrund der Genese unterscheidet man grundsätzlich zwei verschiedene Formen des DI, den DI *centralis* und *renalis*, wobei in beiden Fällen molekulare Störungen des neurosekretorischen AVT-Systems vorliegen. Bei Säugern und Vögeln wird AVP bzw. AVT aufgrund extrazellulärer Hypovolämie und Hypernatriämie sowie arterieller Hypotonie aus der Neurohypophyse direkt in die Blutbahn freigesetzt [Gerstberger *et al.*, 1997; Voigt, 2003]. Beim DI *centralis* des Säugers ist die hypothalamische Bildung bzw. neurohypophysäre Speicherung oder Freisetzung von AVP gestört [Bohus und de Wied, 1998; Ghirardello *et al.*, 2005], der DI *centralis* bei Vögeln ist nicht beschrieben. Die für beide Tierklassen wichtigste physiologische Wirkung des endogen sezernierten AVP/AVT stellt die antidiuretische Wirkung dieses Hormons durch direkte Beeinflussung der renalen Wasserrückresorption dar. Bei Säugern wird dies durch Interaktion von AVP mit membranintrinsic Rezeptorproteinen des V<sub>2</sub>-Subtyps in den Hauptzellen des distalen Tubulus sowie der medullären Sammelrohre vermittelt [Thibonnier *et al.*, 1998; Inoue *et al.*, 2001; Fenton *et al.*, 2007]. Nach intrazellulärer Bildung des sekundären Botenstoffes cAMP kommt es zur Aktivierung der PKA, deren enzymatische Aktivität eine Phosphorylierung membranvesikulär gespeicherter Wasserkanäle des AQP-2 Typs sowie die Inser-

tion dieser präformierten Kanalproteine in die apikale Zellmembran von Hauptzellen der medullären Sammelrohre bedingt [Deen *et al.*, 2000; Noda und Sasaki, 2005]. Durch diese Translokation des intrazellulär vesikulär gespeicherten AQP-2 aus dem Zytoplasma in die apikale Zellmembran erhöht sich die Permeabilität des dichten Epithels der Sammelrohre für Wasser um mehrere Zehnerpotenzen, was letztendlich die Resorption von Wasser aus dem Sammelrohrbereich über das Interstitium in die Blutbahn ermöglicht. Für Mensch und Hund handelt es sich um etwa 10 % des glomerulären Primärfiltrates der Nieren, welches durch die AVP-Wirkung nicht verloren gehen. Hauptursache des DI *renalis* bei allen bis *dato* untersuchten Säugetieren stellen Punktmutationen in Genen dar, welche für den renalen V<sub>2</sub>-Rezeptor oder AQP-2 kodieren [Oksche und Rosenthal, 1998; Knoers und Monnens, 1999]. Die renale Wirkung des AVT beim Geflügel zeigt sich als kombinierte Antinatriurese und -diurese mit glomerulärer und tubulärer Komponente, wobei wie beim Säuger Bereiche des distalen Tubulus sowie die Sammelrohre als Zielstrukturen von Bedeutung sind [Gerstberger *et al.*, 1985; Brummermann und Braun, 1995; Gerstberger, 1997; Goldstein, 2006]. Rezeptorbindungsstudien durch Klonierung vogelspezifischer AVT-Rezeptorgene [Jurkevich *et al.*, 2005; Baeyens und Cornett, 2006] erbrachten Hinweise darauf, dass es sich bei den vogelspezifischen Rezeptorproteinen um zu den V<sub>1a</sub>-, V<sub>1b</sub>- sowie V<sub>2</sub>-Rezeptoren der Säuger unterschiedliche Rezeptorproteine handelt. Die Beteiligung von cAMP als primären intrazellulären Botenstoff der AVT-induzierten Anti-diurese beim Geflügel bleibt bis *dato* ebenfalls umstritten [Gerstberger, 1997; Goldstein, 2006].

In der vorliegenden Arbeit sollte mittels dreier Versuchsansätze der Nachweis einer AVT-induzierten und möglicherweise cAMP-vermittelten Translokation des Wasserkanals AQP-2 in der Hühnerniere erbracht werden, und zwar durch :

- den immunhistochemischen Nachweis einer Translokation vesikulärer AQP-2 Wasserkanäle aus dem Zytosol spezifischer Nierenepithelzellen in deren apikale Zellmembran an Nierengewebeschnitten adulter Hennen vor Einsetzen der ersten Oviposition in Abhängigkeit eines endogen sowie exogen stimulierten AVT-Systems.
- die immunhistochemische Lokalisation von cAMP als potentiell *second messenger* z.B. in Zellen distaler Tubulussegmente/Sammelrohre der Hühnerniere bei Tieren mit endogen bzw. exogen stimuliertem AVT-System.

- rezeptorautoradiographische und Rezeptor-Liganden-Bindungsstudien mittels radioaktiv markiertem AVT (bzw. AVP) an Cryostat-Schnitten bzw. isolierten Plasmamembranen der Hühnerniere zur Charakterisierung nierenspezifischer AVT-Rezeptoren des Huhnes bei Tieren mit endogen bzw. exogen stimuliertem AVT-System.

## 2. KAPITEL Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Geräte

Aqua bidest Anlage Milli-Q Biocel, Millipore, (D-Eschborn)
Cell-Harvester, M-24 R, Brandel, (USA-Gaithersburg)
Elisa-Reader, Digiscan, Asys Hitech GmbH, (Österreich-Eugendorf)
Flüssigkeitsszintillationszähler, Win Spectral 1414, Wallac, (D-Freiburg)
Gefriertrockner Lyovac GT2, Leyboldt-Heraeus, (D-Hanau)
Hämatokritzentrifuge, Heraeus-Christ, (D-Osterode)
Homogenisator mit Potter-Elvehjem-Gerät, Heidolph RZR 2020, Roth, (D-Karlsruhe)
Inkubator, Cellstar, Queue systems, INC., (USA-Ashville)
Kryostat Microm HM 500 O, Microm GmbH, (D-Walldorf)
Kühlzentrifuge, Megafuge 1.0 R., Heraeus Sepatech, (D-Osterode)
Magnetrührer Typ MR 80, Heidolph, (D-Schwabach)
Olympus BX 50 F4 Mikroskop mit Camedia C-3030 Zoom Digital-Kamera, Olympus optical, (D-Hamburg),
Osmometer 5500, Vapor pressure osmometer, Wescor, (USA-Portland)
Perfusionsapparatur, Kerckhoff-Institut, (D-Bad Nauheim)
Perfusionspumpe Perfusor segura, Braun, (D-Melsungen)
pH-Meter 765 Calimatic, Kleinfeld-Labortechnik, (D-Hannover)
Schüttler GFL Typ 3011, Gesellschaft für Labortechnik, (D-Burgwedel)
Schüttler Rct basic, IKA Labortechnik, (D-Staufen)
Schüttler Roto Mix Type 50800, Thermolyne, (USA-Dubuque)
Speed-Vac, SVC-200, Bachofer, D-Reutlingen
Tissue Chopper, Type Mc Ilwain TC 752, Bachofer Laboratoriumsgeräte, (D-Reutlingen)
Trocknungsanlage, Kindermann und Co. GmbH, (D-Ochsenfurt/Main)
Überkopfschüttler VC3, Heidolph, (D-Schwabach)

Ultra-Turrax, TP 18/10, IKA-Labortechnik, (D-Staufen)
Vortex, Reax 2000, Heidolph, (D-Schwabach)
Waage AE 163, Mettler-Toledo GmbH, (D-Gießen)
Waage PM 2500 Delta Range, Mettler-Toledo GmbH, (D-Gießen)
Wärmeschrank, Typ 5050 EK, Heraeus, (D-Osterode)
Zentrifuge, Force 7, Denver Instrument Company, (USA-Denver)

### 2.1.2. *Gebrauchsmaterial*

<p>Computerprogramme:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Adobe Photoshop, Version 5.5, Adobe Systems GmbH, (D-Unterschleißheim)</li> <li>Camedia Master 2.0 Software</li> <li>Graph Pad Prism, Version 3.02, Graph Pad Software, Inc., (USA-Brotherfolt, San Diego)</li> <li>Metamorph, Version 5.05, Diagnostic Instruments-Visitron Systems, (D-Puchheim)</li> <li>Windows Microsoft Word, Version 6.0, Microsoft Corporation, (D-München)</li> <li>Windows Microsoft Excel, Version 6.0, Microsoft Corporation, (D-München)</li> <li>Win TV 32 Software, Hanpange Comp.Works, (D-Mönchengladbach)</li> </ul>
Eppendorfpipetten, 0,5 - 10 µl, 10 - 100 µl, 100 - 1000 µl, MAGV, (D-Rabenau)
Exsikkator, MAGV, (D-Rabenau)
Färbegestell für 25 Objektträger, Brand GmbH, (D-Wertheim)
Färbetrog 9,5 x 8 x 5 cm, Brand GmbH, (D-Wertheim)
Glasfärbeküvette Hellendahl, VWR, (D-Darmstadt)
Hämatokrit-Ableseschablone, Heraeus-Christ, (D-Osterode)
Inkubationskästen mit Deckel 20 x 30 x 5 cm, Biochem Instrumente GmbH, (D-Weilburg)
Magnetrührstäbe, MAGV, (D-Rabenau)
Mikroliterspritze Hamilton-Pipette, Typ N, 25 µl, MAGV, (D-Rabenau)
Multipette 4780, Eppendorf, (D-Hamburg)
Objektträgermappen, MAGV, (D-Rabenau)
Operationsbesteck, Aesculap-Werke AG, (D-Tuttlingen)
Petrischale (Glas), 11 cm, MAGV, (D-Rabenau)
Plexiglasplatten für Immunhistochemie, W.G. Kerckhoff-Institut, (D-Bad Nauheim)

Reagenzglasständer für PS-Röhrchen, PP-Röhrchen, VWR, (D-Darmstadt)
Röntgenkassette, Hypercassette RPN 2643, GE Healthcare (Amersham), (D-Freiburg)
Spatel, Roth, (D-Karlsruhe)
Wheaton Racks für Szintillationsgefäße , Zinsser, (D-Frankfurt)
Zentrifugenröhrchen, A7, Nalgene Nunc 35 ml, (USA-Rochester)

### 2.1.3. Verbrauchsmaterial

Alufolie, Roth, (D-Karlsruhe)
Deckgläschen 24 x 50mm, Menzel GmbH, (D-Braunschweig)
Eichlösung für Osmometer 100, 290, 1000 mOsmol/kg, (USA-Logan)
Einmalhandschuhe N-Dex, MAGV, (D-Rabenau-Londorf)
Einmalkanülen Sterican, 0,45 x 1/2, 26G, 0,9 x 40mm, 20G, 1,2 x 40mm, 18G Braun, (D-Melsungen)
Einmalskalpell Cutfix, Braun, (D-Melsungen)
Einweg-Pasteurpipetten 3 ml, Roth, (D-Karlsruhe)
Einwegspritzen 2 ml und 5 ml, Braun, (D-Melsungen)
Faltenfilter, 113V, Durchmesser: 240 mm, Whatman, (D-Dassel)
Fotokarton, weiß, (D-Heyda)
Glasfaserfilter GF/C 46 x 57cm, Whatman, (D-Dassel)
Hämatokritröhrchen, Science Products GmbH, (D-Hofheim)
Hämatokritversiegelungswachsplatten, Hirschmann Laborgeräte, (D-Eberstadt)
Kieselgel, Merck, (D-Darmstadt)
Klebeband m-Silk, MAGV, (D-Rabenau-Londorf)
Klinge für den Tissue Chopper, Wilkinson, (GB-Nottinghamshire)
Labortücher Kimtech Science, MAGV, (D-Rabenau-Londorf)
Labortücher Kimberly-Clark, Kimwipes-Lite, MAGV, (D-Rabenau-Londorf)
Objektträger 76 x 26 mm, Menzel GmbH, (D-Braunschweig)
Original Perfusor Spritze, 50 ml, Braun, (D-Melsungen)
Parafilm, Roth, (D-Karlsruhe)
PD-Tips 2,5 ml und 5 ml, Brand, (D-Wertheim)

pH-Indikatorpapier, Merck, (D-Darmstadt)
PP (Polypropylen)-Röhrchen steril, 15 ml und 50 ml, Greiner bio-one, (D-Frickenhausen)
Polypropylenschlauch für die Infusion (Außendurchmesser: 0,2 cm, Länge: 90 cm), Roth, (D-Karlsruhe)
PS (Polystyrol) Röhrchen, 5 ml Greiner bio-one, (D-Frickenhausen)
Röntgenfilm Hyperfilm <sup>3</sup> H, GE Healthcare (Amersham), (D-Freiburg)
Rotilabo Einmal-Wiegeschalen blau, Janke + Kunkel GmbH + Co KG, (D-Karlsruhe)
Schraubdeckeldosen, 40 ml, Roth, (D-Karlsruhe)
Scrynel Polyamid, Maschenweite 200 µm, Mesh + Technology, (Schweiz-Rüschlikon)
Serumröhrchen, Sarstedt, (D-Nümbrecht)
Serologische Pipetten 1,5 ml, 10 ml, 25 ml Sarstedt, (D-Nümbrecht)
Sterile multiple well plate 96F, Sarstedt, (D-Nümbrecht)
Superfix Plus Fixierer, Tetenal, (D-Norderstedt)
Szintillationsgefäße Typ Vial, 20 ml, Roth, (D-Karlsruhe)
Tiereinstreu-Faser, Altromin GmbH + Co KG, (D-Lage-Lippe)
Tierfutter Rassegeflügel Aufzuchtfutter, Muskator, (D-Düsseldorf)
Trockeneis, Balsler, (D-Lich)
Tygon-Schläuche (für die Perfusionspumpe), Größe 0,110 und 0,081, Abimed Analysen Technik, (D-Langenfeld)
Ultrafin Plus Feinstkornentwickler, Tetenal, (D-Norderstedt)
Vasofix Braunüle Luer Lock 20G, 1,1 x 33 mm, Braun, (D-Melsungen)
Zellstofftupfer Pur-Zellin, Paul Hartmann AG, (D-Heidenheim)

#### 2.1.4. Chemikalien

Aceton, Sigma Aldrich, (D-Steinheim)
Aceton Ultrarein, Merck, (D-Darmstadt)
[ <sup>3</sup> H]AVP, GE Healthcare Europe GmbH, (D-Freiburg)
[Arg <sup>8</sup> ]Vasopressin, (AVP), Saxon Biochemicals GmbH, (D-Hannover)
[Arg <sup>8</sup> ]Vasotocin, (AVT), Saxon Biochemicals GmbH, (D-Hannover)

Antikörper/Antiseren: Primäre Antikörper/Antiseren: Rabbit anti-rat Aquaporin 2, Alomone Labs, (Israel-Jerusalem) Rabbit anti-cAMP, Chemicon International, (GB-Hamshire) Mouse anti-chicken Carboanhydrase, (freundlicherweise von Herrn Prof. PJ. Linser, C.V. Whitney Laboratory of the University of Florida, St.Augustine, USA zur Verfügung gestellt) Sekundäre Antikörper: Cy 3™ goat anti-rabbit IgG Immunglobulin, Jackson Immunoresearch Laboratories, (USA-West Grove) Alexa® 488 goat anti-mouse IgG Immunglobulin, Molecular Probes, (USA-Oregon)
Äthanol unvergällt, Merck, (D-Darmstadt)
Aquaporin-Peptid, Kontrollantigen, Alomone Labs, (Israel-Jerusalem)
BCA™ Protein Assay Kit, Pierce (USA-Rockford) bestehend aus: Reagenz A (2 x 500 ml), Reagenz B (1 x 25 ml) und Albumin Standard (10 x 1 ml)
Bovines Serum Albumin (BSA), Fraktion V, Sigma Aldrich, (D-Steinheim)
Chromalaun, Chrom-(III)-Kaliumsulfat-Dodecahydrat, Merck, (D-Darmstadt)
Citifluor, LTD, (GB-London)
[Deamino-Cys <sup>1</sup> , D-Arg <sup>8</sup> ]Vasopressin = dDAVP, V <sub>2</sub> -Agonist, Bachem, (D-Weil am Rhein)
4',6-Diamidino-2-Diphenylindoldilaktat (DAPI), MoBiTech GmbH, (D-Göttingen)
Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma Aldrich, (D-Steinheim)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ), Merck, (D-Darmstadt)
Entellan-Einbettmedium, Merck, (D-Darmstadt)
Eosin G-Lösung 0,5 % wässrig für die Mikroskopie, Roth, (D-Karlsruhe)
Gelatine, Serva, (D-Heidelberg)
Hämalaunlösung sauer nach Meyer, Roth, (D-Karlsruhe)
HCl, Merck, (D-Darmstadt)
3 Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX), Sigma Aldrich, (D-Steinheim)
2-Propanol (Isopropylalkohol zur Synthese), Merck, (D-Darmstadt)
Mesotocin, ([Ile <sup>8</sup> ]Oxytocin), Saxon Biochemicals GmbH, (D-Hannover)
MgCl <sub>2</sub> Hexahydrat, Merck, (D-Darmstadt)
Narcoren, Pentobarbital-Na, Merial GmbH, (D-Hallbergmoos)
Natriumchlorid steril, 500 ml, Braun, (D-Melsungen)

Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ), Merck, (D-Darmstadt)
Normal horse serum (NHS), PAA Laboratories GmbH, (Österreich-Linz)
[Phe <sup>2</sup> , Orn <sup>8</sup> ]Oxytocin, V <sub>1</sub> -Antagonist, Bachem Biochemica GmbH, (D-Heidelberg)
Paraformaldehyd (PFA), Merck, (D-Darmstadt)
Petroleumbenzin, Merck, (D-Darmstadt)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Appli Chem GmbH, (D-Darmstadt)
Polyethylenimin (PEI), Sigma Aldrich, (D-Steinheim)
Poly-L-Lysin, Sigma Aldrich, (D-Steinheim)
Rotiszint eco plus, Szintillationsflüssigkeit, Roth, (D-Karlsruhe)
Saccharose, Roth, (D-Karlsruhe)
Natriumchlorid, Sigma Aldrich, (D-Steinheim)
Natriumchlorid steril, Braun, (D-Melsungen)
Tissue Tek, Leica Instruments GmbH, (D-Nussloch)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Merck, (D-Darmstadt)
Triton X-100, Sigma Aldrich, (D-Steinheim)
Xylol, Merck, (D-Darmstadt)

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden weibliche Legehybriden vom Geflügelhof Reinkemeier (Kirchhain-Anzefahr) herangezogen. Die Jungtiere wurden in einem Alter von 6 - 8 Wochen zugekauft und im Institut in einem klimatisch isolierten Raum bei einer Raumtemperatur (RT) von 22°C und einem Tag-Nacht-Zyklus von 12:12 h (Licht an: 07:00 bis 19:00) aufgezogen. Die Unterbringung erfolgte in 1,50 x 1,50 x 1,00 m großen Abteilen zu je drei Tieren in Bodenhaltung auf Spänen. Futter und Wasser wurden mit Ausnahme für die jeweiligen Gruppen I und II während der experimentellen Phase (Kap. 2.2.2.1) *ad libitum* angeboten. Alle Versuchsansätze wurden an adulten, 2 - 4 Monate alten weiblichen Legehybriden vor Einsetzen der ersten Oviposition durchgeführt.

## 2.2.2. Experimentelle Versuchsprotokolle

### 2.2.2.1. Tierversuche

Zur Untersuchung der Lokalisation und Translokation des Wasserkanals AQP-2 (A), der Rezeptorverteilung, Dichte und Affinität für das vogelspezifische antidiuretische Hormon AVT = Vasotocin (B) sowie des Nachweises von cAMP (C) in der Hühnerniere wurden folgende Versuchsansätze durchgeführt :

Teil A: Immunhistochemischer Nachweis der durch endogen erhöhtes (Dehydratation) oder exogen appliziertes [Arg<sup>8</sup>]Vasotocin (AVT) induzierten Expression des Wasserkanals AQP-2 in der Hühnerniere hinsichtlich Lokalisation und Translokation in die luminale bzw. laterale Zellmembran renaler Tubuluszellen.

Teil B: Quantifizierung und Charakterisierung der renalen AVT-Rezeptoren in Abhängigkeit exogener und endogener Stimulation des AVT-Systems durch Rezeptor-Bindungsstudien mit [<sup>3</sup>H]AVP als Radioligand.

Teil C: Immunhistochemische Untersuchung zur Fragestellung, ob die Hormonwirkung des [Arg<sup>8</sup>]Vasotocin in der Hühnerniere durch zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) als *second messenger* vermittelt wird.

Für jedes dieser drei experimentellen Versuchsprotokolle (Tierschutzantrag V54-19 c 20-15 (1) GI 18/2 Nr. 73/2007) wurden folgende drei Tiergruppen (I – III) gebildet:

#### Gruppe I: Endogene Stimulation des AVT-Systems durch Dehydratation

Zur Dehydratation des extrazellulären Flüssigkeitsraumes und die dadurch bedingte endogene Stimulation des AVT-Systems [Gray und Simon, 1983; Stallone und Braun, 1986b] wurde den Versuchstieren für vierzig Stunden das Trinkwasser, nicht jedoch das Futter entzogen. Dies geschah jeweils um 18:00 Uhr des vorgestrigen Tages, so dass die Versuche nach beendeter Versuchsvorbereitung um 10:00 Uhr des Versuchstages beginnen konnten. Am Versuchstag selbst wurden mittels einer sterilen Einmalkanüle (18-G) zwei Blutproben aus der *V. basilica* (Flügelvene) [B1 (0,5 ml) und B2 (2,0 ml)] zum Nachweis der Plasmaosmolalität und des Hämatokritwertes (B1) sowie der AVT-Plasmakonzentration (B2) entnommen.

Gruppe II: Exogene Stimulation durch systemische AVT-Applikation (i.v. Infusion)

Zur exogenen Stimulation des AVT-Systems wurde euhydrierten Versuchstieren [Arg<sup>8</sup>]-Vasotocin systemisch verabreicht. Dazu wurden die euhydrierten Tiere möglichst stressfrei in Rückenlage gebracht und von einer weiteren Person leicht fixiert. Nach durch topische Xylol-Betupfung induzierter lokaler Vasodilatation wurde eine Braunüle (20-G) in die *V. basilica* eingeführt, mit Klebeband am Flügel fixiert und über einen Adapter und einen Polyethylenschlauch mit einer 50 ml Spritze verbunden. Zur Durchführung der Versuchsprotokolle A und B wurden mit Hilfe einer Perfusionspumpe (Perfusor segura) bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min 5,0 ng/min/kg KG (KG = Körpermasse) AVT in steriler, isotoner Natriumchloridlösung für 30 min in den Körperkreislauf der Versuchstiere i.v. infundiert. Für den immunhistochemischen Nachweis des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) in der Niere (Versuchsansatz C) wurden mittels der Perfusionspumpe 50 ng/min/kg KG AVT in steriler, isotoner Natriumchloridlösung mit 10<sup>-3</sup> M/L 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX) für 30 min in den Körperkreislauf der Versuchstiere i.v. infundiert. Sofort nach Beendigung der Infusion wurden aus der kontralateralen Flügelvene mit einer sterilen Einmalkanüle (18-G) zwei Blutproben (B1, B2 siehe Gruppe I) entnommen.

Gruppe III: Kontrolltiere

Als Kontrollgruppe dienten euhydrierte, nicht infundierte Tiere. Diesen Versuchstieren wurde zu Beginn der Durchführung der Versuchsprotokolle A und C mit einer sterilen Einmalkanüle (18-G) zwei Blutproben (B1, B2) aus der Flügelvene entnommen.

Für diese drei Versuchstiergruppen [I.: Endogene Stimulation des AVT-Systems durch Dehydratation, II: Exogene Stimulation des AVT-Systems durch systemische Applikation des AVT (Infusion), III: Kontrollgruppe] wurde pro Versuchsansatz und Gruppe folgende Anzahl an Tieren benötigt: Zum Nachweis der Lokalisation und der Translokation des AQP-2 (Teil A) wurden fünf Tiere pro Gruppe eingesetzt. Zur Detektion des cAMP als möglichen *second messenger* (Teil C) wurden jeweils drei Tiere der endogenen sowie der exogenen Stimulation des AVT-Systems unterzogen, zwei Tiere bildeten die Kontrollgruppe. Zur Bestimmung der Rezeptordichte und -affinität (Teil B) erfolgte bei jeweils sechs Tieren eine endogene bzw. exogene Stimulation des AVT-Systems und sieben Tiere

wurden als Kontrollgruppe herangezogen. Weiterhin wurden die Nieren von drei Kontrolltieren zur Durchführung der kompetitiven Verdrängungsstudie herangezogen.

#### **2.2.2.2. Blut- und Plasmaanalyse**

Die Analyse erfolgte unmittelbar im Anschluss an die venöse Blutentnahme und vor der transkardialen Perfusion (Kap. 2.2.2.4.2). Anhand der Bestimmung des Hämatokritwertes (Hkt) sowie der Plasmaosmolalität (Blutprobe B1) sollte der jeweilige Eu- bzw. Dehydrationsstatus der Versuchstiere aufgezeigt werden. Jeweils drei Hämatokritröhrchen pro Blutprobe (B1) und Tier wurden zügig mit Blut gefüllt und bei 7.000 Umdrehungen/min für 10 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert (Hämatokritzentrifuge, Heraeus). Die Hkt-Werte (L/L) wurden mittels einer Ableseschablone bestimmt. Das verbleibende B1-Volumen wurde für die Gewinnung des Plasmas bei 7.000 Umdrehungen/min und RT für sieben Minuten zentrifugiert (Zentrifuge, Force 7, Denver Instrument Company). Mit Hilfe des nach dem Prinzip der Dampfdruckerniedrigung arbeitenden Wescor 5500 Osmometers, welches vorab mit 100, 290 und 1.000 mOsm/kg Eichlösungen kalibriert worden war, konnte die Osmolalität des Plasmas (10 µl) in mOsm/kg bestimmt werden. Das Messprinzip beruht auf dem Vergleich des erniedrigten, partiellen Dampfdruckes eines Lösungsmittels mit gelösten Molekülen ungeachtet deren Größe, Ladung oder Struktur mit dem partiellen Dampfdruck des reinen Lösemittels. Die Dampfdrücke beider Lösungen sind unterschiedlich und streben jeweils einem Gleichgewichtszustand zu, der sich allmählich durch Kondensation des Lösemittels, gefolgt von freiwerdender Kondensationswärme einstellt. Die sich ergebene Temperaturdifferenz stellt ein Maß für die Dampfdruckerniedrigung durch die Anzahl der gelösten Substanzmoleküle dar (kolligative Eigenschaft). Die exakte Osmolalitätsmessung [mOsm/kg] erfolgte durch Fünffachbestimmungen, wobei der maximale Fehler des Dampfdruckosmometers bei  $\leq 1\%$  lag.

Die Blutprobe (B2) zur Ermittlung der AVT-Plasmakonzentration wurde in einer Kühlzentrifuge bei 4°C und 15.000 Umdrehungen/min für 15 min zentrifugiert. Das von Blutzellen freie Plasma (1,0 ml) wurde abpipetiert und bei -28°C gelagert. Zur Aufbereitung für den AVT-spezifischen Radioimmunoassay (RIA) wurden die tiefgefrorenen Plasma-proben rasch bei Raumtemperatur aufgetaut, zur Proteinfällung mit 2 ml eiskaltem (-20°C) Aceton versetzt und gut gemischt. Nach 10 min Zentrifugation bei 4°C und 4.000 g wurde

der Überstand in Extraktionsröhrchen dekantiert und das Sediment verworfen. Der dekan-  
tierte Überstand wurde mit 4 ml Petroleumbenzin versetzt und für ca. drei min mit einem  
Überkopfschüttler bei Raumtemperatur gemischt. Nach 30 min Stehenlassen bei RT bilde-  
ten sich zwei Phasen; die obere, lipophile Phase wurde mittels Wasserstrahlpumpe abge-  
saugt. Dieser Vorgang wurde nochmals wiederholt, und die nach Absaugen übrig geblie-  
bene wässrige Phase, welche unter anderem Peptidhormone enthielt, wurde über Nacht  
schonend im Speed-Vac gefriergetrocknet. Die Bestimmung der Plasmakonzentration des  
AVT wurde freundlicherweise durch Prof. David A. Gray (Witswater University, Johan-  
nesburg, Südafrika) mit Hilfe eines Radioimmunoassays durchgeführt [Gray und Simon,  
1983; Gerstberger *et al.*, 1984b]. Die jeweils gemittelten Werte der Hämatokrit- [L/L]  
(jeweils Dreifachmessungen pro Blutprobe und Tier) und Plasmaosmolalitäts-Messungen  
[mOsm/kg] (jeweils Fünffachbestimmungen pro Blutprobe und Tier) sowie Bestimmun-  
gen der AVT-Plasmakonzentration jedes Tieres (jeweils Dreifachbestimmungen) und  
Gruppe wurden in das Programm GraphPad überführt. Die Darstellung Blut-/Plasmawerte  
anhand ihrer Mittelwerte mit Standardfehler (S.E.M.) erfolgte anhand von Balkendiagram-  
men. Für den statistischen Vergleich der drei Versuchsgruppen kam der nicht-parame-  
trische Mann-Wilcoxon U-Test [Sachs, 2004] zur Anwendung. Unterschiede zwischen den  
Mittelwerten der jeweiligen Blut- bzw. Plasmadaten wurden als signifikant wie folgt  
markiert :  $2P \leq 0,05(*)$ ,  $2P \leq 0,01(**)$  und  $2P \leq 0,001(***)$ .

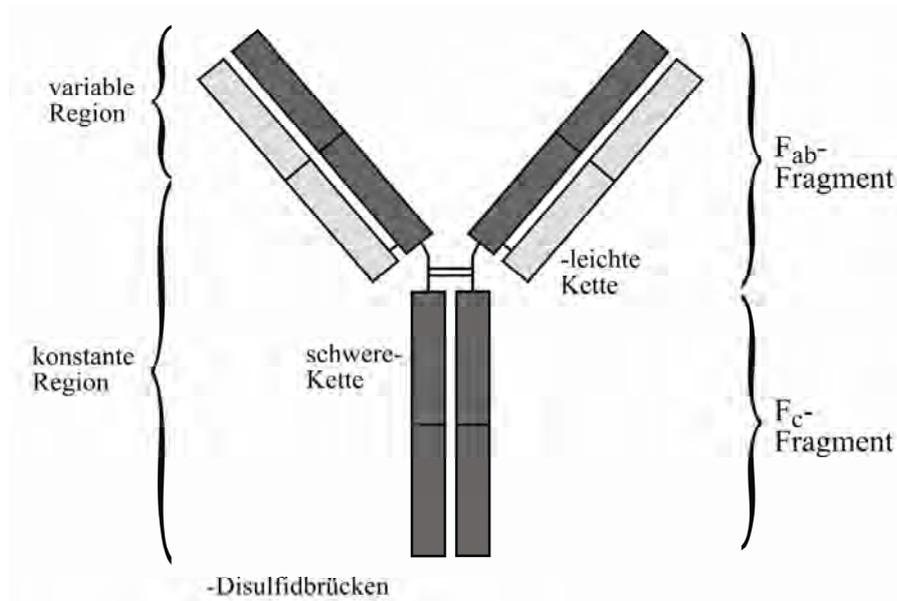
### **2.2.2.3. Immunhistochemie, Allgemeine Grundlagen**

Die Grundlage der Immunhistochemie bildet die Interaktion zwischen hochspezifischen  
mono- bzw. polyclonalen Antikörpern (Ak)/Antiseren mit dem jeweils nachzuweisenden  
Antigen (Ag) im Gewebeschnitt. Antigene wie zum Beispiel Proteine oder Peptide besitzen  
spezielle Determinanten (Epitope), die von der F<sub>ab</sub>-Region des Ak erkannt und somit  
Antigen-Antikörper Komplexe (Ag-Ak Komplexe) bilden werden [Janeway und Travers,  
1997; Janeway *et al.*, 1999]. Auf diese Weise können bei Anwesenheit von spezifischen  
Antikörpern Antigene in Geweben detektiert werden [Harlow und Lane, 1988]. Immun-  
globuline (Ig) sind von Plasmazellen sowie Gedächtniszellen synthetisierte und sezernierte  
Glycoproteine, die als Antikörper in Serum, Gewebeflüssigkeiten und Körpersekreten vor-  
kommen und spezifisch mit Antigenen reagieren. Die allen Immunglobulinen und somit  
auch dem IgG zugrunde liegende Struktur ist ein Y-förmiges Proteinmolekül, welches aus

zwei jeweils paarweise vorhandenen Polypeptidketten mit einem Kohlenhydratanteil besteht. Man unterscheidet leichte (L-) Ketten und schwere (H-) Ketten, welche über symmetrisch angeordnete Disulfidbrücken und nichtkovalente Bindungen verbunden sind (Abb. 9). Der jeweiligen Immunglobulinklasse entsprechend werden die H-Ketten als  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  und  $\mu$ , L-Ketten als  $\chi$  und  $\lambda$  bezeichnet. Vergleicht man die Aminosäuresequenzen von Immunglobulinen, so lassen sich Bereiche mit hoher Konstanz und Homologie feststellen, wobei der konstante Teil der H-Kette als  $C_H$ , derjenige der leichten Kette als  $C_L$  bezeichnet wird. Die Bindungsstelle für das entsprechende Antigen liegt im Bereich der endständigen Aminosäuren der L- und H-Ketten (also der  $F_{ab}$ -Fragmente), welche hinsichtlich ihrer Sequenz eine außerordentliche Variabilität aufweisen, so dass hier von variablen oder hypervariablen Bezirken gesprochen wird ( $V_H$ - und  $V_L$ -Domänen). Beide V-Bereiche der leichten und schweren Kette bilden den Bindungsbereich des Immunglobulinmoleküls für das Antigen und bedingen die Vielfalt der Antikörperspezifität. Innerhalb der hypervariablen Region existiert ein Abschnitt, der als Paratop bezeichnet wird und die tatsächliche Bindungsstelle für das antigene Epitop darstellt [Liddell und Weeks, 1996; Dröbner und Gemsa, 2000]. Es entsteht ein Antigen-Antikörperkomplex mit hoher Affinitätskonstante  $K_D$  [Janeway und Travers, 1997; Janeway *et al.*, 1999]. Durch Spaltung mit der Protease Papain lassen sich Antikörpermoleküle in drei Fragmente zerlegen:

- 1.) Die schon bereits erwähnten beiden  $F_{ab}$ -Fragmente (*fragment antigen binding*) sind in der Lage, Antigene zu binden. Sie bestehen aus den beiden Schenkeln des Y-förmigen Immunglobulins, die jeweils aus der variablen und konstanten Domäne der L-Ketten, sowie jeweils der variablen und einer konstanten Domäne der H-Ketten gebildet werden.
- 2.) Das  $F_c$ -Fragment (*fragment crystallizable*) wird aus je zwei konstanten Domänen der H-Ketten gebildet und enthält den gesamten Kohlenhydratanteil des Antikörpers.

Der histologische Nachweis von Antigen-Antikörperkomplexen im Gewebe kann durch direkte und indirekte Markierungsverfahren erfolgen. Ist der primäre Antikörper, d.h. der Antikörper, welcher gegen das nachzuweisende Epitop im Gewebe gerichtet ist, selbst mit einem Fluorophor bzw. Enzym markiert, so handelt es sich um die Methode der direkten Immunhistochemie. Bei der indirekten Immunfluoreszenz bindet an den Ag-

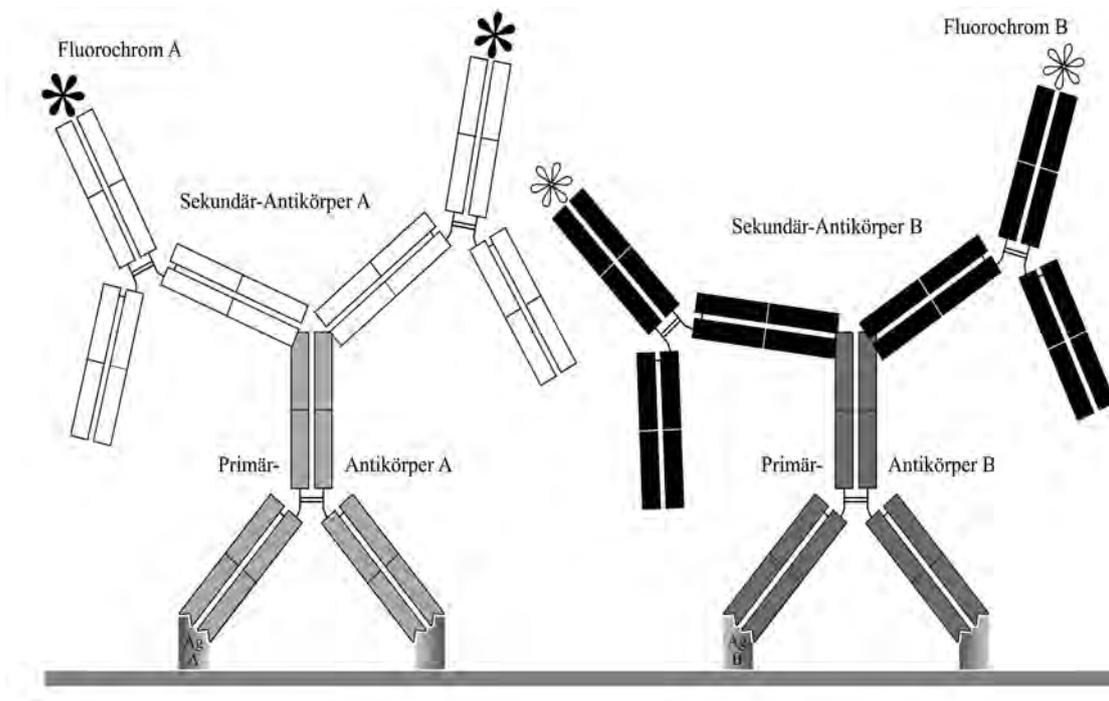


**Abb. 9 :** Schematische Darstellung eines Antikörpermoleküls.

Jedes Antikörpermolekül besteht aus zwei **schweren** und zwei **leichten Ketten**, welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die aminoterminalen Domänen jeder Kette stellen **variable Bereiche** dar, alle anderen Domänen **konstante Bereiche**. Enzymatisch lässt sich das Ig-Molekül in funktionell unterschiedliche Fragmente spalten: Zwei antigenbindende **F<sub>ab</sub>-Fragmente** und ein **F<sub>c</sub>-Fragment**, welches zur Verankerung des Immunglobulins an der Oberfläche etwa von B-Lymphozyten dient.

spezifischen, unmarkierten Primär-Ak ein sekundärer, etwa mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelter Ak, der gegen die F<sub>c</sub>-Region des Primär-Ak (Abb. 10) gerichtet ist. Dieser Ag-Ak Komplex wird durch Anregung des Fluorophors bei entsprechender Wellenlänge mittels eines Fluoreszenzmikroskops sichtbar gemacht, indem es durch Filterung zur Emission der längerwelligen Strahlung kommt. Durch Verwendung primärer Aks aus unterschiedlichen Tierspezies und geeigneten Sekundärantikörpern mit unterschiedlichen Fluorophoren kann mit der indirekten Immunfluoreszenz die gleichzeitige Detektion mehrerer Antigene (Doppel- oder Dreifachmarkierungen) erfolgen [Liddell und Weeks, 1996]. In dieser Arbeit wurde die Methodik der indirekten Immunfluoreszenz [Coons, 1958] gewählt. Von Vorteil sind die hohe Sensitivität, die fehlende Modifikation des primären Antikörpers sowie die Tatsache, dass Mehrfachmarkierungen möglich sind. Der Nachteil der Fluoreszenzmarkierung liegt darin, dass Fluorophore bei Anregung vor allem im UV-Bereich relativ schnell ausbleichen; spezielle Einbettmedien (*anti-fading* Mittel) können dieses Ausbleichen jedoch verzögern [Janeway und Travers, 1997]. Mit Hilfe der

Immunhistochemie sollte durch Mehrfachmarkierung die Lokalisation sowie die durch [Arg<sup>8</sup>]Vasotocin induzierte Translokation des AQP-2 in der Hühnerniere nachgewiesen und der Frage nachgegangen werden, ob cAMP als *second messenger* der AVT-medierten Rezeptoraktivierung in der Hühnerniere dient.



**Abb. 10 :** Prinzip der Doppelmarkierung mittels indirekter Immunfluoreszenz. Der Antigen-spezifische, unmarkierte **Primärantikörper A (B)** bindet mit seinem F<sub>ab</sub>-Fragment an das Epitop des **Antigens A (Ag A), (B) (Ag B)**. Mit Hilfe des **Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpers**, welcher gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers A bzw. B gerichtet ist, kann der Antigen-Antikörper-Komplex sichtbar gemacht werden.

#### 2.2.2.4. Immunhistochemischer Nachweis von Aquaporin-2 (AQP-2), zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und der Carboanhydrase II (CA-II) in der Niere

##### 2.2.2.4.1. Verwendete Lösungen für die transkardiale Perfusion

Zur transkardialen Perfusion der narkotisierten Versuchstiere (siehe unten) wurden folgende Lösungen eingesetzt :

##### Isotonische Kochsalzlösung (Saline) zur Perfusion

Um sämtliches Blut aus dem Gefäßsystem zu entfernen, wurden die tief narkotisierten Hühner mit 0,9 % steriler Kochsalzlösung bei RT transkardial perfundiert.

### Phosphatpuffer (PB)

Der Phosphatpuffer (PB), welcher sowohl für die transkardiale Perfusion als auch die immunhistochemische Aufarbeitung der Nierenschnitte benötigt wurde, wurde aus zwei Stocklösungen angesetzt. Stocklösung A bestand aus 0,2 M/L Dinatriumhydrogenphosphat, Stocklösung B aus 0,2 M/L Natriumdihydrogenphosphat, jeweils in *Aqua bidest.* gelöst. Durch Mischung der beiden Stocklösungen (720 ml NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 280 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) wurde ein 0,2 M/L PB hergestellt, welcher mit der gleichen Menge *Aqua bidest* (1 L) auf eine Molalität von 0,1 M/L verdünnt wurde. Nach gutem Durchmischen wurde der errechnete pH-Wert (pH 7,25 - 7,4) mit einem pH-Indikatorpapier überprüft. PB wurde vor den entsprechenden Versuchen stets frisch angesetzt.

### Paraformaldehyd-Lösung, (PFA 4 %)

Die Wirkung des Fixierungsmittels Paraformaldehyd (PFA, kurzkettiges Polymer des Formaldehyds) beruht auf der Kreuzvernetzung reaktiver Gruppen zwischen Polypeptidketten (*cross-linking*). Für die transkardiale Fixierung der Hühnernieren wurde eine 4 % PFA-Lösung jeweils unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt, um die rasch einsetzende Polymerisation des Fixativs zu limitieren. Hierzu wurden 40 g reinstes PFA unter dem Abzug abgewogen und in 1 L PB bei 62°C unter ständigem Rühren gelöst. Anschließend wurde die Lösung filtriert und auf 4°C abgekühlt. Der pH-Wert, der mittels pH-Indikatorpapier überprüft wurde, lag zwischen 7,25 und 7,4.

### Saccharoselösung

Die extipierten Nieren wurden vor dem Einfrieren zum Auswaschen überschüssiger Fixierlösung sowie zum kryoprotektiven Schutz des Gewebes für vier Stunden in 20 % Saccharose überführt. Dazu wurden 20 g Saccharose in 100 ml PB unter ständigem Rühren gelöst und die erhaltene Lösung auf 4°C gekühlt.

#### **2.2.2.4.2. Narkose und transkardiale Perfusion**

Ziel der transkardialen Perfusion war die vollständige Elimination des Blutes aus dem gesamten Gefäßbett ohne (Versuchsprotokoll B) oder mit nachfolgender Fixierung des Gewebes (Versuchsprotokolle A, C). Um eine ausreichend tiefe Narkose für die transkardiale Perfusion des Huhnes zu erreichen, wurden 400 mg/kg KG Pentobarbital-Natrium

(=Narcoren) in einem entsprechenden Volumen von 2,5 ml Narcoren/kg KG mittels einer sterilen Einmalkanüle (G26) in das *Cavum peritonei intestinalis* (peritonealer Abschnitt des Rumpfzöloms) appliziert. War eine ausreichende Narkosetiefe erreicht, was durch das Ausbleiben des Flexorenreflexes beim Setzen eines mechanischen Reizes auf die Spannhaut angezeigt wurde, wurde das Versuchstier in Rückenlage auf einem Gitterrost über einer Wanne innerhalb eines Abzugs fixiert. Die Bauchhöhle wurde caudal der *Trabecula mediana* des *Sternum* eröffnet. Durch laterale Incisionen der Rippen und anschließendes Hochklappen des *Sternum* wurde das Herz freigelegt. Rasch wurde das *Pericard* eröffnet und die transkardiale Perfusion durch Platzierung einer Einmalkanüle (G18), welche mit der Perfusionsapparatur verbunden war und über die Herzspitze in den *Ventriculus sinister* bis zum Beginn des Aortenbogens geschoben wurde, eingeleitet. Nach Eröffnen des *Atrium dexter* erfolgte die Perfusion des gesamten Blutgefäßsystems mit steriler isotonischer Kochsalzlösung bei einem hydrostatischen Druckgefälle zwischen Pufferreservoir und Versuchstier von 80 - 120 mmHg, entsprechend dem arteriellen Blutdruck des Huhnes [Wideman und Gregg, 1988]. Nach 2 - 3 min bei einem applizierten Gesamtvolumen von 250 - 350 ml erwies sich der Abfluss der Perfusionslösung aus dem rechten Vorhof als makroskopisch klar und somit blutfrei. Für Versuchsprotokoll C wurde dem Perfusat  $10^{-3}$  M/L 3-Isobutyl-Methylxanthin zugesetzt, um den raschen Abbau von cAMP durch cAMP-spezifische Phosphodiesterasen zu hemmen [Coffin und Spealman, 1989].

Für die Versuchsprotokolle A und C wurde im direkten Anschluß eine transkardiale Fixierung der Gewebe durchgeführt. Hierzu wurden das Blutgefäßsystem des Huhnes zusätzlich mit 250 - 350 ml 4 % PFA-Lösung (4°C) bei einem Druck von 80 - 120 mmHg in einem Zeitraum von ca. 3 - 5 min in gleicher Weise wie zuvor mit der Saline-Lösung perfundiert. Die Nieren wurden sofort nach Beendigung der Perfusion freigelegt und mittels Pinzette und Schere von abdominal aus ihren Einbuchtungen an der Ventralseite des *Synsacrum* und *Ileum* entnommen. Direkt nach der Entnahme wurden die *Divisiones renales* mit einem sterilen Skalpell in ca. 0,8 x 0,8 x 0,8 cm große Nierenstücke geteilt und für vier Stunden in 4 % PFA-Lösung bei 4°C nachfixiert. Anschließend wurden die Nierenfragmente über Nacht bei 4°C in 20 % Saccharose inkubiert, in pulverisiertem Trockeneis bei -78°C schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung in Aluminiumfolie bei -28°C aufbewahrt.

**2.2.2.4.3. Verwendete Lösungen sowie Vorbereitungen für die Immunhistochemie**

Präinkubationspuffer

Der Präinkubationspuffer (PIP) diente dazu, unspezifische Bindungsloci der antigenspezifischen Antikörper zu blockieren und somit die Hintergrundfärbung bei der nachfolgenden Immunhistochemie zu minimieren. Die Grundlage des PIP stellte der PB dar, welchem unter vorsichtigem Rühren *normal horse serum* (NHS) und Triton-X-100 bis zu einer Endkonzentration von 10 % (NHS) respektive 0,3 % (Triton) zugegeben wurden. Die Funktion des NHS beruht auf der Maskierung unspezifischer Bindungsstellen, während Triton-X-100 als mildes Detergens durch Permeabilisierung der Zellen einen erleichterten Zugang der IgG-Moleküle zu ihren intrazellulären oder membranintrinsic Antigenen bewirkt. Das Ansetzen des PIP erfolgte stets unmittelbar vor Versuchsbeginn.

Primär- und Sekundärantikörper

<b>Primär-Antikörper</b>	<b>Hersteller/Konzentration</b>
Anti-AQP-2 Polyclonal, hergestellt im Kaninchen	Alomone Labs <i>Arbeitsverdünnung 1:2000</i>
Anti-cAMP Polyclonal, hergestellt im Kaninchen	Chemicon International <i>Arbeitsverdünnung 1:500</i>
Anti-Carboanhydrase II Hybridomüberstand, Monoclonal, hergestellt in der Maus	PJ.Linser, Whitney Laboratory, University of Florida, USA <i>Arbeitsverdünnung 1:50</i>
<b>Sekundär-Antikörper</b>	<b>Hersteller/Konzentration</b>
Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG [H + L]	Molecular Probes <i>Arbeitsverdünnung 1:500</i>
Cy3™ goat anti-rabbit IgG [H + L]	Jackson Immunoresearch Lab. <i>Arbeitsverdünnung 1:500</i>

**Tab. 2 : Übersicht über die in der Immunhistochemie eingesetzten Primär-Antiseren/-körper sowie Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper.**

Zum Nachweis nephronaler Antigene in der Hühnerniere wurden polyclonale Primär-Antiseren (Anti-Aquaporin-2 und Anti-cAMP) sowie ein monoclonaler Primär-Antikörper (Anti-CA-II) eingesetzt. Angabe von Bezugsquellen und Arbeitsverdünnungen der Antikörperlösungen.

### Inkubationspuffer

Primäre/sekundäre Antiseren/-körper, welche in der Immunhistochemie am fixierten Gewebsschnitt eingesetzt wurden, wurden in der jeweils entsprechenden Verdünnung in Inkubationspuffer (IP) gelöst, dessen Grundlage der PB darstellte. Diesem wurden unter vorsichtigem Rühren NHS und Triton-X-100 bis zu einer Endkonzentration von 2 % (NHS) respektive 0,1 % (Triton) zugegeben.

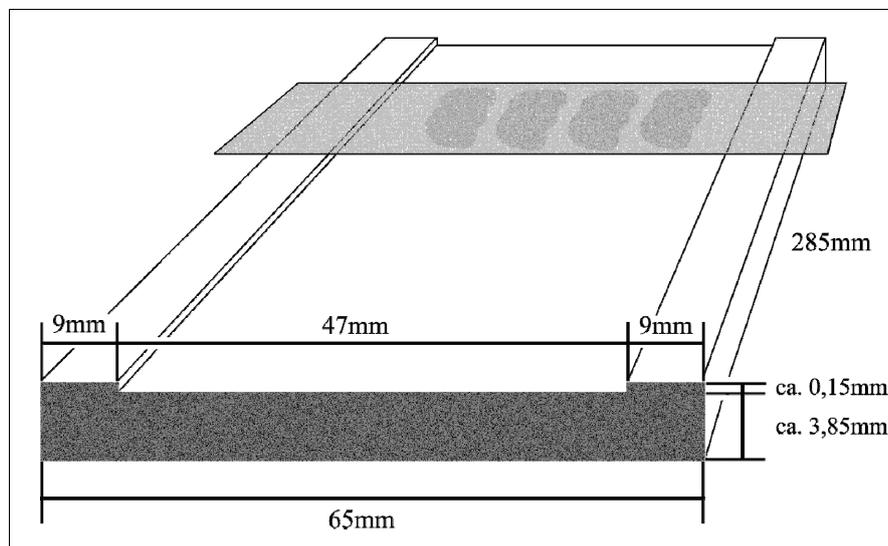
### Beschichtung der Objektträger

Die Beschichtung der Objektträger (OT) erfolgte durch 5-min Inkubation in einer 10 % Poly-L-Lysin Lösung bei Raumtemperatur mit anschließender Trocknung im Wärmeschrank bei 60°C. Diese Vorbehandlung erfolgte mit dem Ziel, durch die Beschichtung vermehrt positive Ladungsträger auf den OT aufzubringen, mit welchen anionische Molekülstrukturen der Gewebeschnitte in Wechselwirkung treten konnten. Die OT wurden während des Schneidens in Färbegestellen (à 25) auf Eis aufbewahrt.

#### **2.2.2.4.4. Durchführung der Immunhistochemie**

Von den Nieren wurden stets Gefrierschnitte angefertigt, mit Ausnahme der Paraffinschnitte für die Gegenfärbung mit Hämatoxylin-Eosin (Kap. 2.2.2.4.7). Die tiefgefrorenen, perfusionsfixierten Nierenstücke wurden (meist am Folgetag der Perfusion) in einem Kryostat bei einer Kammertemperatur von -23°C mit der Schnittfläche auf dem Objekthalter mittels Einbettmedium aufgeblickt. Alle der bei einer Gewebblocktemperatur von -18°C gewonnenen Gewebeschnitte (4 - 6 µm Schnittdicke je nach Fragestellung) wurden direkt auf vorgekühlten, zuvor mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern aufgenommen. Die indirekte Immunfluoreszenz wurde angewandt, um durch immunhistochemische Mehrfachmarkierung die Lokalisation und durch AVT-induzierte Translokation des AQP-2 (Versuchsprotokoll A) sowie zelluläre Lokalisation der Carboanhydrase-II (CA-II) in der Hühnerei nachzuweisen [Hübschle *et al.*, 2001; Harré *et al.*, 2003; Mütze *et al.*, 2006; Rummel *et al.*, 2005]. Weiterhin wurde untersucht, ob zyklisches Adenosinmonophosphat als *second messenger* des [Arg<sup>8</sup>]Vasotocin fungiert (Versuchsprotokoll C). Die am Kryostat geschnittenen und auf Eis aufbewahrten Nierenschnitte wurden dreimal für 5 min in PB rehydriert. Sowohl die Präinkubation als auch die Inkubation mit den Ak-Lösungen wurde mittels Plattentechnik durchgeführt. Hierzu wurde die entsprechende

Anzahl an OTs mit den adherierten Gewebeschnitten nach unten weisend (*upside-down*) auf dafür speziell angefertigten Inkubationsplatten angeordnet (Abb. 11) und in einen geschlossenen, mit *Aqua bidest.* steril befeuchteten und Zellstoff-Mullkompressen ausgelegten Inkubationskasten aus Edelstahl verbracht. Zwischen den bis zu 2 x 4 übereinander angeordneten Inkubationsplatten sorgten Abstandshalter dafür, einen direkten Kontakt der Platten untereinander zu vermeiden. Diese Methode minimiert sowohl durch die wasserdampfgesättigte Atmosphäre als auch durch die „upside-down-Methode“ die Austrocknungsgefahr der Schnitte während der Inkubation. Um eine gleichmäßige Verteilung zu erzielen, wurden pro OT 200 µl an PIP bzw. entsprechenden Ak-Lösungen im Anschluss an die Präinkubation zwischen die Inkubationsplatten und die mit Nierenschnitten versehenen OT pipettiert (Abb. 11). Zur Reduzierung der unspezifischen Ak-Bindungsstellen wurden die Schnitte zunächst für 60 min bei RT mit PIP inkubiert. Die nachfolgende Inkubation mit den jeweiligen Primär-Antikörpern/-seren erfolgte bei 4°C für eine Dauer von 48 Stunden. Nach Ablauf der Inkubation wurden die mit Nierenschnitten versehenen OT von den Inkubationsplatten vorsichtig abgenommen und in Färbegestellen dreimal für fünf min bei RT in PB zur Entfernung ungebundener Primär-Antikörper gewa-



**Abb. 11 :** Praktische immunhistochemische Durchführung der Ag-Ak Interaktion.

Schematische Skizze der Inkubationsplatte mit aufliegendem Objektträger für die Inkubation der Nierenschnitte mit den entsprechenden Ak-Lösungen für den zellulären Nachweis für AQP-2, cAMP und/oder Carboanhydrase II Expression. Die mit den Nierenschnitten nach unten liegend versehenen OT wurden mit Ak-haltiger Inkubationslösung (200 µl pro OT) in einer Schichtdicke von ca. 150 µm gleichmäßig benetzt. Angaben der Dimensionen in mm (nach Mütze *et al.* [2006]).

schen. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation mit den Fluorophor-gekoppelten Sekundär-Antikörpern für zwei Stunden bei RT mittels Inkubationsplatten-Technik im Dunkeln. Nach einem weiteren Waschschrift für 3 x 5 min in PB wurde die Kernfärbung mit DAPI durchgeführt.

Dazu wurden die in Färbegestelle einsortierten OT für 10 min im Dunkeln und bei RT mit DAPI in einer Endkonzentration von 300 pM/L, gelöst in 0,1 M/L PB und 0,1 % Triton-X-100 inkubiert. Bei DAPI handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, welcher auf Grund seiner interkalierenden Eigenschaften zur Markierung doppelsträngiger DNA eingesetzt wird, wobei die Anlagerung des DAPI bevorzugt an AT-reiche Regionen in der kleinen Furche der DNA stattfindet [Tanious *et al.*, 1992]. Nach einem letzten Waschschrift (3 x 5 min in PB) konnten die OT luftblasenfrei mit Citifluor gedeckelt werden.

#### ***2.2.2.4.5. Negativkontrollen***

##### Nachweis der Spezifität des Primär-Antikörpers für AQP-2

Um die Spezifität des primären polyclonalen Antiserums gegen Ratten-spezifisches AQP-2 für den Nachweis von AQP-2 in der Hühnerniere aufzuzeigen, wurden in jedem immunhistologischen Experiment bei vier Objektträgern dem IP kein primärer Antikörper zugesetzt. Darüber hinaus wurde die Spezifität der rAQP-2 spezifischen Immunmarkierung in der Hühnerniere durch Präinkubation des Antiserums mit dem für die Immunisierung eingesetzten Oligopeptid (C)RQSVELHSPQSLPRGSKA, welches der Aminosäuresequenz 254-271 des Ratten-spezifischen AQP-2 entspricht, „abgesättigt“. Dabei erfolgte die Präinkubation bei einem Antikörper : Antigen Verhältnis von 1,0 : 10 µg (bzw. nahezu 1 : 1 entsprechend der jeweiligen Molalität) für fünf Stunden bei RT, mit nachfolgendem Einsatz des „abgesättigten“ Antikörpers für den immunhistochemischen Nachweis von AQP-2 in tubulären Strukturen der Hühnerniere. Dies galt ebenfalls für den Nachweis von cAMP und Carboanhydrase II (CA-II). Sowohl die Präinkubation als auch die Inkubation mit den sekundären Antikörpern erfolgten wie oben beschrieben.

#### ***2.2.2.4.6. (Semi-)quantitative Auswertung der Immunfluoreszenz-Mikroskopie***

Die immunhistochemische Darstellung der AQP-2 sowie der CA-II Expression in Nierenschnitten des Huhnes erfolgte mit einem Olympus BX50 F4 Fluoreszenz-Mikroskop durch den Einsatz unterschiedlicher Filterblöcke. Die Anregung eines Fluorophors mit Licht

geeigneter Wellenlänge durch den Einsatz spezieller Filter führte zu einer jeweils längerwelligen Emissionsstrahlung. So wurde das Ak-gekoppelte Alexa-Fluor-488 durch Licht mit einer Wellenlänge von 450 - 490 nm angeregt, was zu einer maximalen Emission von Licht mit einer Wellenlänge von 510 - 530 nm, also im grünen Bereich des Spektrums, führte. Anregung von AK-gebundenem Cy3<sup>TM</sup>, einem sehr leuchtintensiven und photostabilen Fluoreszenzfarbstoff, erfolgte durch Licht einer Wellenlänge von 510 - 530 nm, wodurch es zu einer maximalen Emission von Licht mit einer Wellenlänge von 630 - 660 nm, also im roten Bereich des Spektrums kam. Die Anregung von DAPI als Zellkernspezifischem Marker erfolgte bei 360 nm; das emittierte Licht mit einer Wellenlänge von 460 nm lag im blauen Bereich des Spektrums. Die unterschiedlichen und nur minimal überlappenden Anregungs- sowie Emissionsbereiche von Alexa-Fluor-488, Cy3<sup>TM</sup> und DAPI - sowie der Einsatz eines Sperrfilters – ermöglichten eine Mehrfachmarkierung im histologischen Schnitt der Hühnerniere. Hierzu wurde der jeweils gewählte Bildausschnitt eines Präparates sequentiell bei allen drei Filterkombinationen durch eine b/w Restlichtkamera aufgenommen und mit entsprechender Software (Metamorph 5.05) bearbeitet. Dabei wurde für alle Auswertungen im RGB-Modus die Expression von AQP-2 in rot, cAMP oder Carboanhydrase in grün und DAPI in blau dargestellt.

Zum Nachweis der Lokalisation und Translokation von AVT-induziertem AQP-2 (Versuchsansatz A) erfolgte die schon erwähnte Durchführung der Versuche für die Gruppen I (endogene Stimulation des AVT durch Dehydratation), II (exogene Stimulation durch AVT-Applikation) und III (Kontrollgruppe), mit jeweils fünf Tieren. Pro Tier wurden aus den *Divisiones cranialis, medialis* und *caudalis* der Niere jeweils 3 - 4 Gewebeschnitte (4 - 6 µm) angefertigt und immunhistochemisch markiert. Dabei wurden im Mittel pro Gewebeschnitt je drei der Kernstrukturen *Cortex renalis* (CR), kortikaler (cMK) und medullärer Markkegel (mMK) quantitativ ausgewertet, um Aussagen über die AQP-2 Translokation machen zu können. Bei einer durchschnittlichen Anzahl von 10 quergeschnittenen Sammelrohren pro Kernstruktur (mit je 10 Hauptzellen) ergab sich eine Auswertung von mindestens 100 Zellen pro Kernstruktur, Schnitt, *Divisio* und Tier. Für jedes Tier wurden somit etwa 8.100 (100 Zellen x (3 x 3) Kernstrukturen x 3 Schnitte x 3 Divisiones) AQP-2 immunpositiver Hauptzellen ausgewertet und anhand der jeweiligen AQP-2 Expressionsmusters sieben unterschiedlichen Kategorien (A - G) der AQP-2 Lokalisation zugeordnet

und gezählt. Dabei lagen den Kategorien A - G folgende AQP-2 Verteilungsmuster zu Grunde:

- [A] Diffuse AQP-2 Verteilung im gesamten Zytoplasma, schwache Markierung
- [B] Diffuse AQP-2 Verteilung im gesamten Zytoplasma, starke Markierung
- [C] Partikuläre, zytosolisch-submembranale AQP-2 Verteilung,
- [D] Zytosolisch-subapikale AQP-2 Verteilung
- [E] Apikal (sub-)membranale AQP-2 Verteilung
- [F] Lateral (sub-)membranale AQP-2 Verteilung
- [G] Apikal und lateral (sub-)membranale AQP-2 Verteilung

Zellen wurden nur dann berücksichtigt, wenn eine eindeutige Identifizierung und Zuordnung ihres AQP-2 Expressionsmusters sowie Lokalisation von Zytosol und Zellkern gegeben waren. Die jeweils ermittelte Gesamtzellzahl AQP-2 immunpositiver Epithelzellen einer Gewebsregion (*Cortex renalis*, cMK und mMK) und Versuchsgruppe (I – III) wurde als 100 % gesetzt und der Anteil der Kategorien A - G jeweils in Prozent der Gesamtzellzahl angegeben. Für den direkten Vergleich der immunhistologisch nachweisbaren Translokation des AQP-2 aus dem Zytosol in die Membran zwischen den drei Versuchsgruppen I – III wurde für jede Darstellung des Anteils einer der sieben Zellkategorien A - G ein nicht-parametrischer Mann-Wilcoxon-U-Test und Signifikanzniveaus von  $2P \leq 0,05$  (\*),  $2P \leq 0,01$  (\*\*) und  $2P \leq 0,001$  (\*\*\*) herangezogen (GraphPad Prism). Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehler (S.E.M.) in Balkendiagrammen dargestellt.

Zum Nachweis zellulärer cAMP-Signale (Versuchsansatz C) als möglichem *second messenger* der endogen bzw. exogen erhöhten Plasmakonzentration an  $[\text{Arg}^8]$ Vasotocin erfolgte wiederum eine Einteilung der Tiere in die drei oben genannten Versuchsgruppen (I - III). Serielle Nierenschnitte (4 - 6  $\mu\text{m}$ ) aus den *Divisiones renalis cranialis*, *medialis* und *caudalis* der Hühnerniere wurden für den Nachweis einer möglichen Co-Distribution von cAMP mit AQP-2 alternierend auf drei verschiedene Objektträger aufgenommen, da eine direkte Co-Lokalisation beider Antigene aufgrund der Herkunft beider Antiseren aus Kaninchen technisch nur eingeschränkt möglich war. Folglich wurden OT-1 mit dem Primär-Antiserum gegen AQP-2 und OT-2 mit Primär-Antiserum gegen cAMP inkubiert, wohingegen OT-3 durch eine HE-Markierung (Kap. 2.2.2.4.7) gegengefärbt wurde. Alle Aufnahmen wurden mit derselben Belichtungszeit durchgeführt und unter identischen Bedingungen bildanalytisch (Adobe Photoshop 5.5) bearbeitet.

#### **2.2.2.4.7. Hämatoxylin-Eosin Färbung von Schnitten der Hühnerniere**

Vorraussetzung für eine korrekte Auswertung der in der Immunhistochemie erfassbaren, zellulären AQP-2 Expression war eine genaue Kenntnis der Morphologie der komplexen Vogelniere (Kap. 1.2.1). Aus diesem Grund wurden zur histologischen Differenzierung aller Substrukturen der MT- und RT-Nephrene Paraffinschnitte (4 µm) der Hühnerniere einer Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) unterzogen. Die Anfertigung und Färbung der Paraffinschnitte erfolgte freundlicherweise durch das Institut für Veterinäranatomie/-histologie. Darüber hinaus wurden für den Nachweis der AQP-2 Expression immunhistochemisch prozessierte Nierenschnitte anschließend zur exakten Bestimmung der markierten Nephronsegmente im eigenen Labor mit HE gegengefärbt.

Die Nierenschnitte wurden für 10 min in einer Glasfärbeküvette mit PB rehydriert, mit nachfolgender kurzer Waschung in *Aqua bidest.* und Inkubation für 10 min bei RT in Hämatoxylin-Lösung. Daraufhin wurden die Schnitte kurz in *Aqua bidest.* getaucht und für 10 min (unter Sichtkontrolle) unter fließendem Leitungswasser gebläut, wodurch das Chromatin der Zellkerne blau erschien. Nach nochmaligem kurzen Waschschrift in *Aqua bidest.* schloss sich die Inkubation in 0,5 % Eosinlösung für drei min ebenfalls bei RT an. Das saure Eosin führte zu einer rosafarbenen Tönung des Zytoplasmas und der Interzellularsubstanz. Danach wurden die Schnitte in eine mit *Aqua bidest.* gefüllte Färbeküvette überführt, kurz gespült und anschließend in 90 % Isopropanol kurzzeitig inkubiert. Es folgte eine 2 x 3 min Spülung in reinem Isopropanol mit anschließender Inkubation für neun Minuten in Xylol und Deckeln der OT unter dem Abzug mit Entellan-Einbettmedium. Die Analyse der HE-gefärbten Nierenschnitte wurde mit einem Olympus BX50 F4 Mikroskop im Durchlichtverfahren durchgeführt. Zur Dokumentation der Ergebnisse wurden Aufnahmen mit einer Olympus Camedia Zoom Digital-Kamera gemacht und eine Bildbearbeitung mit Adobe Photoshop im RGB-Modus durchgeführt.

#### **2.2.2.5. Rezeptorbindungsstudien für [<sup>3</sup>H]AVP in der Niere des Huhnes**

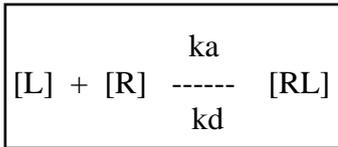
##### **2.2.2.5.1. Kinetik der Rezeptor-Liganden Interaktion**

Bei Rezeptoren für hydrophile Hormone, Neurotransmitter oder Pharmaka handelt es sich um membranintrinsische Proteine mit hoher Spezifität und Affinität für den jeweiligen Liganden und nachfolgender intrazellulärer Signaltransduktion bzw. Öffnung membran-

ständiger Ionenkanäle. Im Gegensatz zum physiologischen Liganden, der meist nach Bindung an den Rezeptor einen zellulären Effekt hervorruft, also agonistisch wirkt, kann man bei Pharmaka zwischen Agonisten (Substanzen, die an den Rezeptor binden und diesen aktivieren) und Antagonisten (Substanzen, die zwar an den Rezeptor binden, diesen jedoch nicht aktivieren und im Falle einer kompetitiven Hemmung etwa die Bindung des endogenen Liganden sterisch unterbinden), unterscheiden. Die Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor basiert auf ionischen oder hydrophoben Wechselwirkungen, van der Waals Kräften oder Wasserstoffbrückenbindung, wobei meistens eine Kombination dieser Bindungsarten vorliegt [Repke und Liebmann, 1990].

In der *induced-fit* Theorie werden die Vorstellungen über die physikalisch-chemischen Veränderungen der Agonist-Rezeptor Wechselwirkung zusammengefasst. Sie basiert auf der Tatsache, dass Enzyme bei der Reaktion mit ihren Substraten ihre Konformation ändern. Erst nach Ausbildung der Komplementärstruktur, der gegenseitigen Anpassung von Substrat und Enzym, läuft die Reaktion ab. So sind Agonisten Substanzen, die zu einer Konformationsänderung des Rezeptors befähigt sind, während Antagonisten zwar an den Rezeptor gebunden werden, dessen Konformation aber mehr oder weniger nicht ändern [Birnbaumer, 2000].

Mit Hilfe von Radioligand-Bindungsstudien (= Radiorezeptorassay) läßt sich die Affinität des jeweiligen Liganden zu seinem Rezeptorprotein sowie Konzentration bzw. Anzahl der entsprechenden Bindungsstellen in der Gewebepräparation bzw. den Zielzellen bestimmen. Das Prinzip besteht in der Inkubation einer gereinigten bzw. angereicherten Plasmamembran-Fraktion mit dem in radioaktiver Form vorliegenden Liganden (= Radioligand). Auf enzymkinetischen Grundlagen basierend (Sättigungscharakteristik nach Michaelis-Menten) bilden Ligand [L] und Rezeptor [R] durch hochaffine, nicht-kovalente Bindung einen reversiblen Rezeptor-Liganden Komplex [LR]. Das Reaktionsgleichgewicht ist laut Massenwirkungsgesetz abhängig von den jeweiligen Assoziations- ( $k_a$ ) und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten ( $k_d$ ).



$$ka = [RL]/[L] \times [R] \quad kd = [L] \times [R]/[RL]$$

- [L] = Konzentration des Liganden
- [R] = Konzentration des freien Rezeptors
- [LR] = Konzentration des Ligand-Rezeptor Komplexes
- ka = Assoziationsgeschwindigkeitskonstante
- kd = Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante

### Sättigungsexperimente und Scatchard-Analyse

Bei Sättigungsexperimenten, in denen die Konzentration des Radioliganden bei konstanter Rezeptorkonzentration systematisch erhöht wird, ergibt die Auftragung der Konzentration des Rezeptor-Radioligand Komplexes [LR] gegen die Konzentration des freien Radioliganden [L] eine hyperbole Kurve mit Sättigungskinetik, deren Verlauf durch eine der Michaelis-Menten Kinetik äquivalente Gleichung beschrieben wird. Ist die Bildungsgeschwindigkeit von [LR] gleich der Zerfallsgeschwindigkeit des Komplexes [LR], so wird der Quotient aus kd/ka als Gleichgewichtskonstante der Dissoziation ( $K_D$ ) bezeichnet, die ein Maß für die Affinität des Liganden für seinen Rezeptor darstellt:

$$K_D = kd/ka = [L] \times [R]/[RL]$$

Die Gleichgewichtskonstante der Dissoziation  $K_D$  entspricht der Ligandenkonzentration bei halbmaximaler Besetzung der vorhandenen Rezeptormoleküle durch die Ligandenmoleküle. Je niedriger der  $K_D$  Wert, desto höher ist die Affinität des Liganden zur betreffenden Bindungsstelle. Die maximale Anzahl an Rezeptoren ( $R_T = B_{max}$ ) ergibt sich aus der Summe freier [R] sowie im Komplex gebundener Rezeptormoleküle [LR], so dass sich aus obiger Gleichung folgende nach Scatchard [1949] benannte Funktion formulieren lässt:

$$[RL] = \frac{[R_T] \times [L]}{K_D + [L]}$$

Nach Umformung der Scatchard-Funktion ergeben sich folgende Gleichungen:

$$\begin{aligned} \frac{[RL]}{[L]} &= -1/K_D \times [RL] + 1/K_D \times [R_T] && \text{bzw.} \\ B/F &= -1/K_D \times B + 1/K_D \times B_{\max} \end{aligned}$$

[LR]= B (gebunden)

[L]= F (frei)

[R<sub>T</sub>]= B<sub>max</sub> (maximale Anzahl an Bindungsstellen)

Die aus der Scatchard-Funktion abgeleitete Scatchard-Gleichung ermöglicht eine Linearisierung der Bindungsdaten und wird somit für die Bestimmung der Bindungsaffinität des Radioliganden sowie der maximalen Rezeptoranzahl herangezogen. Dazu erfolgt die graphische Darstellung des Quotienten aus spezifisch gebundenen (B) zu freiem Liganden (F) auf der y-Achse und des spezifisch gebundenen Liganden (B) auf der x-Achse. Bei Vorhandensein lediglich eines Rezeptortyps entsteht eine Gerade, deren Steigung dem negativ reziproken Wert der Gleichgewichtskonstante der Dissoziation ( $-1/K_D$ ) entspricht. Viele Rezeptoren weisen jedoch ein nicht lineares Bindungsprofil auf. Diesem Phänomen kann die Heterogenität der Bindungsstellen an der Einzelzelle oder in der Population, die Kooperativität der Rezeptorproteine, eine Modifikation der Bindung durch partiell degradierte Ligandenfragmente, die Heterogenität oder Aggregation des Liganden oder eine unterschiedliche down-Regulation mit Folge einer differenten Rezeptorbesetzung und Internalisierung zugrunde liegen [Repke und Liebmann, 1990]. Über den Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der x-Achse und über die spezifische Aktivität des Radioliganden (Ci/mmol) wird die maximale Anzahl an Bindungsstellen ( $B_{\max}$  in fmol) ermittelt. Bei Bezugnahme auf die Proteinkonzentration kann die Rezeptordichte pro eingesetzter Proteinkonzentration bestimmt werden (fmol/mg Protein). Unter Einbeziehung der Avogadro-Konstante und dem jeweiligen Molekulargewicht kann aus dem  $B_{\max}$ -Wert die absolute Anzahl an Rezeptoren etwa pro Proteineinheit abgeleitet werden; Untersuchungen an Zellkulturen ermöglichen die Bestimmung der Rezeptoranzahl pro Zelle.

$$R = [R_0] \times 6,022 \times 10^{23} / ZZ$$

R = Zahl der Rezeptoren

R<sub>0</sub> = molare Rezeptor-Konzentration

ZZ = Zellzahl pro Liter

Kompetitive Verdrängungsstudien

Mit Hilfe kompetitiver Verdrängungsstudien kann das Vorhandensein eines oder mehrerer Subtypen des jeweiligen Rezeptors sowie dessen Affinität für bestimmte Liganden festgestellt werden. Im Gegensatz zu Sättigungsexperimenten besteht das Prinzip der kompetitiven Verdrängung darin, dass der Radioligand in einer konstanten Konzentration, die unterhalb derjenigen der Dissoziationskonstanten liegen sollte, und der jeweils nicht radioaktiv markierte Ligand in über mehrere Zehnerpotenzen steigenden Konzentrationen eingesetzt wird. Bei „konkurrierendem Verhalten“ von radioaktiv markiertem und nicht radioaktiv markiertem Liganden um die Bindungsstellen des Rezeptors wird der Radioligand durch steigende Konzentrationen an nicht radioaktiv markierten Liganden von den Rezeptorbindungsstellen kompetitiv „verdrängt“ (Verdrängungsprinzip). Zur Ermittlung einer kompetitiven Verdrängungskurve wird die in Abwesenheit des unmarkierten Liganden ermittelte maximale Bindung des Radioliganden (T) als 100 % gesetzt, und die jeweilige Bindung des Radioliganden in Anwesenheit steigender Konzentrationen an unmarkiertem Liganden in Prozent von T auf der y-Achse aufgetragen. Es resultiert ein sigmoidaler Kurvenverlauf, anhand dessen der IC<sub>50</sub>-Wert bestimmt werden kann. Gemäß der Michaelis-Menten-Kinetik gibt der IC<sub>50</sub>-Wert die Konzentration an nicht markiertem Liganden an, bei welcher dieser 50 % des Radioliganden vom Rezeptor verdrängt (IC<sub>50</sub>-Wert, M/L). Je höher die Affinität des unmarkierten Liganden für die vom Radioliganden besetzte Bindungsstelle ist, desto niedriger also der dazugehörige IC<sub>50</sub>-Wert (M/L). Die Dissoziationskonstante des unmarkierten Liganden (K<sub>i</sub>) steht zum IC<sub>50</sub>-Wert in enger Beziehung, wobei diese von der Konzentration der freien Radioliganden und der Dissoziationskonstanten des Radioliganden (K<sub>D</sub>) abhängig ist. Die Gleichung nach Cheng und Prusoff [1973] beschreibt die lineare Abhängigkeit des IC<sub>50</sub>-Wertes eines Inhibitors von der Konzentration eines kompetitiven Agonisten; je niedriger die Ligandenkonzentration, desto mehr gleicht sich der IC<sub>50</sub> Wert der Verdrängungskonstante K<sub>i</sub> an.

$K_i = IC_{50} + F/K_D$
-------------------------

- K<sub>i</sub> = Verdrängungskonstante
- IC<sub>50</sub> = inhibiting concentration 50 %
- F = Konzentration des freien Radioliganden
- K<sub>D</sub> = Gleichgewichtsdissoziationskonstante

### Die unspezifische Bindung

Problematisch bei der Auswertung von Bindungsdaten ist die unspezifische Bindung. Bei der Bewertung der zu messenden Radioaktivität des eingesetzten Liganden wird zwischen der gesamten Aktivität (TO), der nicht-spezifisch gebundenen Aktivität (NSB) und der unter Berücksichtigung der Differenz TO - NSB sich ergebenden spezifischen Bindung des jeweils zu bestimmenden Rezeptor-Liganden-Komplexes unterschieden. NSB umfasst Bindungen des Liganden an Fremdproteine des Probenmaterials, zugesetzte Reagenzien oder Arbeitsmaterialien; sie ist nicht sättigbar, sondern steigt proportional zur Konzentration des (Radio-)Liganden an. Unspezifische Bindungsstellen sind oft in höherer Anzahl vorhanden als spezifische. Demgegenüber ist die Affinität des Liganden zu den unspezifischen Bindungsstellen deutlich geringer ausgeprägt als zu den spezifischen. Um den Anteil an unspezifischer Bindung zu erfassen, wird der unmarkierte Ligand im Überschuss eingesetzt. Der Radioligand wird aufgrund dieses Konzentrationsverhältnisses (1 : 100 - 1000) vollständig von der geringen Anzahl spezifischer Bindungsstellen verdrängt. Die noch messbare Bindung an markierten Liganden entspricht somit NSB.

#### ***2.2.2.5.2. Verwendete Lösungen für den [<sup>3</sup>H]AVP Radiorezeptorassay***

##### Waschpuffer

Der Waschpuffer diente dazu, nicht gebundenes [<sup>3</sup>H]AVP bei der Vakuumfiltration rasch aus der Inkubationslösung bzw. dem Glasfaserfilter zu entfernen, ohne mit dem Rezeptor-Liganden-Komplex der auf dem Filter adhierten Plasmamembranen zu interferieren. Bei einer Zusammensetzung aus 0,1 M/L PB mit pH 7,2, 0,09 % NaCl und 0,01 % BSA (Reinigungsgrad V) wurde der Waschpuffer immer auf 2 - 4°C im Eisbad gekühlt. Das BSA wurde stets erst am Versuchstag zugesetzt.

##### Radiorezeptorpuffer

Der Puffer für den Radiorezeptorassay (RRA-Puffer) wurde bei der Aufarbeitung des Nierengewebes sowie der Durchführung der Bindungsstudien eingesetzt und setzte sich aufgrund der Vorversuche (Kap. 2.2.2.5.4) zusammen aus:

30 mM/L Tris/HCl, pH 8,2	5 mM/L MgCl <sub>2</sub> Hexahydrat
50 mM/L NaCl	10 <sup>-4</sup> M/L PMSF
100 mM/L Saccharose	

Erfolgte die Verwendung des RRA-Puffers zum Ansetzen und Lösen von Hormonen ( $[^3\text{H}]\text{AVP}$ , AVT etc.), so wurde dem RRA-Puffer 0,02 % BSA zugesetzt. Der RRA-Puffer wurde stets frisch angesetzt und auf Eis gehalten.

#### Polyethyleniminlösung

Zur Neutralisation negativer Oberflächenladungen im Glasfaserfilter (Whatman Filter) erfolgte für drei Std. eine Inkubation der Filterstreifen (siehe unten) in einer 0,1 % Lösung aus Polyethylenimin (PEI) in *Aqua bidest.*

Zur Bestimmung der Radioligandenbindung sowohl in Sättigungsexperimenten mit nachfolgender Scatchard-Analyse als auch in kompetitiven Verdrängungsstudien zur Charakterisierung des vogelspezifischen, renalen AVT-Rezeptors wurden folgende Neuropeptide der AVT/AVP Familie eingesetzt:

Kurzbezeichnung	Neuropeptid	Hersteller
$[^3\text{H}]\text{AVP}$	$[\text{Arg}^8]\text{Vasopressin}$ (Tritium-markiert)	Perkin Elmer Life and Analytical Sciences (USA-Boston)
$[\text{Arg}^8]\text{AVP}$	$[\text{Arg}^8]\text{Vasopressin}$	Saxon Biochemicals GmbH (D-Hannover)
$[\text{Arg}^8]\text{AVT}$	$[\text{Arg}^8]\text{Vasotocin}$	Saxon Biochemicals GmbH (D-Hannover)
MESO	Mesotocin = $[\text{Ile}^8]\text{Oxytocin}$	Saxon Biochemicals GmbH (D-Hannover)
$\text{V}_1\text{-R Agonist}$	$[\text{Phe}^2, \text{Orn}^8]\text{Oxytocin}$	Bachem Biochemica GmbH (D-Heidelberg)
dDAVP, $\text{V}_2\text{-R Agonist}$	$[\text{Desamino-Cys}^1, \text{D-Arg}^8]\text{Vasopressin}$	Bachem (D-Weil am Rhein)

**Tab. 3 :** Synthetische Neuropeptide für  $[^3\text{H}]\text{AVP}$  Bindungsstudien an der Hühnerniere. Angabe von Kurzbezeichnung, genauerer Bezeichnung der Neuropeptide und Bezugsquellen.

#### **2.2.2.5.3. Präparation zellulärer Plasmamembranen aus der Niere des Huhnes**

Für die Rezeptorbindungsstudien (Versuchprotokoll B) erfolgte die transkardiale Perfusion der Tiere unter Pentobarbitalnarkose (Kap. 2.2.2.4.2) mit 200 - 250 ml RRA und rascher Entnahme des Nierengewebes *post-mortem*. Nach Gewichtsbestimmung der Nierenfrag-

mente in einer Petrischale gefüllt mit eiskaltem RRA wurden diese mittels sterilem Einmalskalpell zerkleinert und nachfolgend mit einem McIlwain *tissue chopper* bei 2 - 4°C bei hoher Geschwindigkeit und 4 - 5 Durchläufen mit einer Schnittbreite von 120 µm aufgearbeitet [Schütz *et al.*, 1992; Gerstberger, 1997]. Anschließend wurde das Nierenhomogenat mit eiskaltem RRA über ein Polyamidnetz mit definierter Porengröße (200 µm) filtriert und das Filterpräzipitat mit Hilfe eines Ultra-Turrax zweimal für je 30 sec bei 2.000 U/M nochmals zerkleinert. Ein schonender Zellaufschluss mit Ruptur der Plasmamembranen sowie teilweise der Membransysteme aus Kern und Mitochondrien erfolgte in einem mit eiskaltem RRA-Puffer gefüllten Potter-Elvehjem Homogenisator (Glaszylinder mit rotierendem Teflonpistill).

Für die Anreicherung der Plasmamembranfraktion wurde das feine Homogenat zunächst für 10 min bei 1.500 U/min und 4°C in einer Beckmann-Kühlzentrifuge von unaufgeschlossenen Zellen befreit. Die nachfolgende Hochgeschwindigkeitszentrifugation (20.000 U/min = 45.000 g) des Überstandes bei ebenfalls 4°C resultierte in der schichtweisen Pelletierung der verbliebenen Kerne und Mitochondrien, deren Membranen sowie der Plasmamembranen (PM) mit geringster spezifischer Dichte (1,034 g/ml), wie in Einzelfällen durch Percollgradienten-Zentrifugation bestätigt. Die PM-angereicherte, opaque äußerste Schicht des Pellets wurde vorsichtig mit einem sterilen Spatel abgetragen, in eiskaltem RRA-Puffer rehomogenisiert und einer weiteren Zentrifugation bei 45.000 g unterzogen. Die PM-angereicherte, jetzt breitere Schicht des Pellets wurde entfernt und in einem vierfachen Volumen an RRA - bezogen auf das Ausgangsgewicht des Nierengewebes - aufgenommen und im Elvehjem-Potter rehomogenisiert. Von der so gewonnenen PM-Fraktion wurden je Tier 3 x 50 µl bei -24°C für die spätere Proteinbestimmung aufbewahrt, der Großteil der PM-Präparation für die Durchführung des RRAs verwendet.

#### ***2.2.2.5.4. Durchführung des [<sup>3</sup>H]AVP RRA für die Niere des Huhnes***

##### Vorversuche

Zur Durchführung vergleichender Scatchard-Analysen an der Hühnerniere von Tieren der drei Versuchsgruppen I – III erfolgte in Vorversuchen eine nähere Charakterisierung der biophysikalischen und ionalen Abhängigkeiten der Bindungseigenschaften von [<sup>3</sup>H]AVP (spezifische Aktivität : 44 Ci/mmol) an eine angereicherte Plasmamembran-Fraktion der

Hühnerniere. Neben der Zeit- (15 - 90 min) und Temperaturabhängigkeit (2°C, RT) der Radioligandenbindung (0,5 nM/L [<sup>3</sup>H]AVP in Ab- (= TO) bzw. Anwesenheit von 10<sup>-6</sup> M/L Vasotocin (=NSB)) wurde auch die Abhängigkeit der Bindung des Liganden an seinen Rezeptor von der ionalen Zusammensetzung des Inkubationsmediums durch Variation verschiedener Ionenkonzentrationen bestimmt:

NaCl-Konzentrationen: 30, 60, 120, 150 mM/L

MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen: 1, 2, 3, 5, 10 mM/L

H<sup>+</sup>-Konzentrationen: pH 6,5/7,0/7,5/8,0/8,5/9,0

Die Notwendigkeit von Enzyminhibitoren zur Stabilisierung der Liganden-Rezeptor-Interaktion wurde mit Versuchen in Gegenwart von 10<sup>-4</sup> M/L PMSF aufgezeigt. Die hier erzielten Ergebnisse bildeten die Grundlage für die finale Zusammensetzung des RRA-Puffers (Kap. 2.2.2.5.2) sowie den [<sup>3</sup>H]AVP spezifischen RRA.

#### Scatchard-Analysen zur Bestimmung von K<sub>D</sub> und B<sub>max</sub>

Zur Bestimmung der Affinität sowie Konzentration AVT-spezifischer Rezeptorproteine in Nieren von Hühnern der Versuchsgruppen I (Dehydratation), II (AVT-Infusion) und III (Euhydratation) wurden Sättigungsexperimente mit einem endgültigen Reaktionsansatz von je 0,5 ml pro PS-Röhrchen durchgeführt. Für jede der 12 Konzentrationen an [<sup>3</sup>H]AVP mit einer Bandbreite von 10<sup>-10</sup> bis 2 x 10<sup>-8</sup> M/L wurden sowohl zur Ermittlung der Gesamtbindung (TO) als auch der unspezifischen Bindung (NSB) Dreifachbestimmungen durchgeführt. Im Folgenden das Pipettierschema :

##### Für die Bestimmung der Gesamtbindung (TO) :

300 µl RRA-Puffer inkl. 0,02 % BSA

100 µl radioaktiv markiertes AVP in RRA-Puffer inkl. 0,02 % BSA

100 µl Membransuspension in RRA-Puffer

##### Für die Bestimmung der unspezifischen Bindung (NSB) :

300 µl RRA-Puffer inkl. 0,02 % BSA und 10<sup>-6</sup> M/L AVT

100 µl radioaktiv markiertes AVP in RRA-Puffer inkl. 0,02 % BSA

100 µl Membransuspension in RRA-Puffer

Die Durchführung der Scatchard-Versuche erfolgte bei RT und wurde durch die Zugabe der Membransuspension und vorsichtigem, aber raschen Mischen der Probenansätze

gestartet. Nach einer 60 min Inkubation wurde die Bindungsreaktion mittels Vakuumfiltration, Adhäsion der mit [<sup>3</sup>H]AVP markierten PM an den PEI-saturierten Whatman GF/C-Glasfaserfilter und Auswaschen des ungebundenen Radioliganden innerhalb von 15 sec beendet [Schütz *et al.*, 1992]. Die halbautomatisierte Prozessierung mittels *cell harvester* erbrachte die Möglichkeit, 24 Proben gleichzeitig zu prozessieren und die jeweils an den Filter adherierten Plasmamembranen mit 3 x 4 ml eiskaltem Waschpuffer nachzuwaschen. Im Anschluss wurden die jeweils markierten 24 Filterblättchen eines Glasfaserfilters mittels Pinzette aus diesem entnommen, in Szintillationsröhrchen übertragen und dort mit je 10 ml Rotiszint-eco-plus Szintillationsflüssigkeit überlagert. Nach Verschluss und kräftigem Mischen wurden alle Szintillationsröhrchen eines Versuches über Nacht bei 4°C und Dunkelheit unter einem Abzug gelagert, um die vollständige Auflösung des Filterblättchens sowie Extraktion von [<sup>3</sup>H]AVP aus der wässrigen Filterphase in die organische Szintillator-Phase zu gewährleisten. Die Messung der zuvor PM-gebundenen Radioaktivität erfolgte für drei min pro Probe in einem gekühlten β-Counter bei einer nachweislichen 69,5 % Zähleffizienz. In Anwesenheit der Szintillationsflüssigkeit, bestehend aus einem Cocktail aromatisch-phenolischer Verbindungen mit hohem π-Elektronenanteil, erfolgte dabei eine durch die β-Strahlung des Tritiums hervorgerufene Photoemission im sichtbaren Bereich des Spektrums. Die entstehenden Lichtblitze werden durch Photomultiplier-Technologie erfasst.

### Kompetitive Verdrängungsstudien

Zur näheren pharmakokinetischen Charakterisierung des Rezeptorsystems für [Arg<sup>8</sup>]Vasotocin in der Niere des Huhnes wurden kompetitive Verdrängungsstudien mit einer PM-Präparation aus euhydrierten Kontrolltieren, [<sup>3</sup>H]AVP als Radioligand in einer konstanten Konzentration von  $1,0 \times 10^{-9}$  M/L und mehreren Neuropeptidanaloga in 12 steigenden Konzentrationen von  $3 \times 10^{-12}$  bis  $10^{-6}$  M/L durchgeführt. Als Analoga dienten AVT, AVP, Mesotocin, [Phe<sup>2</sup>, Orn<sup>8</sup>]Oxytocin als V<sub>1</sub>-R spezifischer Agonist sowie dDAVP als V<sub>2</sub>-R spezifischer Agonist. Wie bei den Sättigungsexperimenten betrug der endgültige Reaktionsansatz 0,5 ml pro PS-Röhrchen, und für TO sowie jede der 12 Konzentrationen eines Neuropeptidanalogs wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Im Folgenden das Pipettierschema :

Für die Bestimmung der Radioligandenbindung :

300 µl RRA-Puffer bzw. nicht markiertes Neuropeptid (Konz. 1 – 12) in  
RRA-Puffer inkl. 0,02 % BSA

100 µl radioaktiv markiertes AVP ( $1 \times 10^{-9}$  M/L) inkl. 0,02 % BSA

100 µl Membransuspension in RRA-Puffer

Nach Beendigung der Inkubation bei RT für 60 min wurde die Reaktion mit Hilfe des *cell harvester* gestoppt und mit den Proben ebenso verfahren wie mit denjenigen für die Scatchard-Analyse [Schütz *et al.*, 1992; Brenner und Gerstberger 1999].

#### **2.2.2.5.5. Proteinbestimmung**

Für die Kalibrierung der Scatchard-Analysen und somit als Grundlage für den direkten Vergleich der  $K_D$ - und  $B_{max}$ -Werte zwischen den Versuchsgruppen I – III wurden die  $B_{max}$ -Werte [mol] auf die in der jeweiligen PM-Präparation vorliegende Proteinkonzentration [bestimmt als µg/ml] bezogen [fmol/mg Protein]. Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der in den Rezeptorbindungsstudien eingesetzten PM-Fractionen erfolgte mit einem Protein Assay Kit und BSA als Standardprotein. Zur Erstellung der Standardkurve wurden 10 Konzentrationen an BSA (0, 50, 125, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 2000 µg/ml) eingesetzt. Die PM-Fractionen wurden nach raschem Auftauen 1 : 5 mit RRA-Puffer verdünnt und gut durchmischt (Vortex). Pro *well* einer 96-Loch Platte wurden dann jeweils 25 µl der entsprechenden Standardkonzentration bzw. verdünnten PM-Fraktion pipettiert, wobei für jeden Standard bzw. jede PM-Probe Vierfachbestimmungen durchgeführt wurden. Nach Zugabe von je 200 µl an Lösung C (bestehend aus 9 Anteilen Lösung A und 1 Anteil Lösung B des Assay Kit) erfolgte die Inkubation für 30 min bei 37°C im Wärmeschrank. Die quantitative Bestimmung des gebildeten Proteinfarbstoff Komplexes erfolgte durch Messung der optischen Dichte mit einem Elisa-Reader bei einer Wellenlänge von 550 nm.

#### **2.2.2.5.6. Auswertung**

Unter Einbeziehung des Inkubationsvolumens (0,5 ml), der Zähleffizienz des  $\beta$ -Counters (69,5 %) und der Tages-aktualisierten, spezifischen Aktivität des Radioliganden (44 Ci/mmol) war es möglich, aus den durch die  $\beta$ -Counter-Zählung erhaltenen DPM-Werten

(decays-per-min) Molaritäten (mol) bzw. molare Konzentrationen (M/L) des gebundenen Radioliganden bzw. AVT-Rezeptors zu errechnen. Die graphische Darstellung der Sättigungskurven inklusive der linearisierten Umformung in Scatchard-Plots, mit Berechnung der  $K_D$ - und  $B_{max}$ -Werte, sowie der kompetitiven Verdrängungskurven, mit Berechnung der  $K_i$ -Werte, wurde mit Hilfe des Programmes GraphPad Prism 3 durchgeführt. Für den statistischen Vergleich der  $K_D$ -,  $K_i$ - und  $B_{max}$ -Werte wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney Rangtest [Sachs, 2004] und Signifikanzniveaus von  $2P \leq 0,05$  (\*),  $2P \leq 0,01$  (\*\*\*) und  $2P \leq 0,001$ (\*\*\*\*) herangezogen (GraphPad Prism 3).

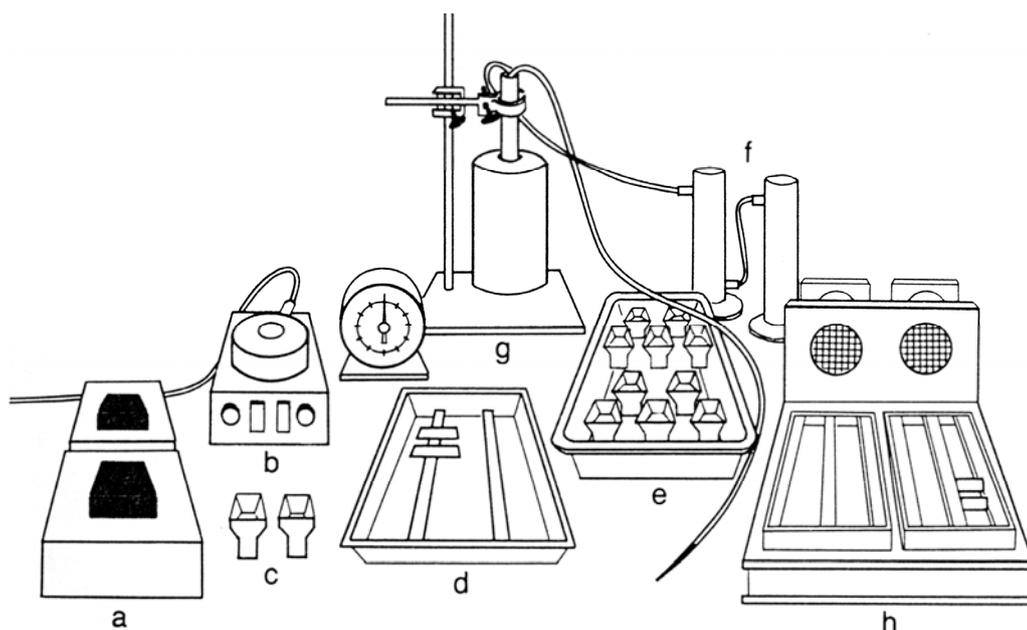
#### **2.2.2.5.7. Rezeptorautoradiographie für [<sup>3</sup>H]AVP in der Niere des Huhnes**

Die Autoradiographie stellt ein photographisches Verfahren zum Nachweis radioaktiver Isotope dar, inkorporiert in oder gebunden an zelluläre bzw. molekulare Strukturen. Das sich nach Entwicklung einer(s) photosensitiven Emulsion bzw. Filmmaterials ergebende Schwärzungsbild (Autoradiogramm) spiegelt die lokale Verteilung sowie Konzentration des jeweiligen radioaktiven Isotopes wider. In der Biomedizin kommen als wichtigste Radioisotope solche mit  $\beta$ -Strahlung (<sup>3</sup>H], [<sup>14</sup>C], [<sup>32</sup>P], [<sup>35</sup>S]) oder niederenergetischer  $\gamma$ -Strahlung (<sup>125</sup>I) in Betracht. Die für die Autoradiographie verwendeten Medien enthalten Silberbromid in mikrokristalliner Form. Durch die radioaktive Strahlung wird lokales Silberbromid ionisiert; die freigesetzten Elektronen können Silberionen zu metallischem Silber reduzieren. Die räumliche Auflösung einer Autoradiographie hängt ab vom eingesetzten Radioisotop, der mittleren Reichweite und Streubreite der Strahlung sowie dem optimalen Kontakt zwischen Film/Emulsion und Präparat. Dabei wird die Empfindlichkeit meist über die Zahl der Silberkörner in Emulsion/Filmmaterial angegeben, die z.B. durch 100 radioaktive Zerfälle erzeugt werden. Zur histologischen Lokalisation von spezifischen membranintrinsicen Bindungsstellen für einen Neurotransmitter oder ein Hormon in einem bestimmten tierischen Organ inkubiert man unfixierte Gewebeschnitte des Organs mit einem radioaktiv markierten Liganden von hoher spezifischer Aktivität (Ci/mmol), der selektiv und hochaffin an diese Bindungsstellen (= Rezeptoren) bindet. Nach Entfernen des ungebundenen Anteils an Radioligand wird der Gewebeschnitt einem Röntgenfilm exponiert, so dass dessen (deren) Silberionen durch die radioaktive Strahlung lokal und spezifisch gebunden reduziert werden, und es lokal zu einer graduierten Schwärzung des Filmes kommt [Kuhar *et al.*, 1991; Frey und Albin, 2001].

### Versuchsdurchführung

Zur Lokalisation der spezifischen Bindungsstellen für [<sup>3</sup>H]AVP ([<sup>3</sup>H]AVT ist weder kommerziell erhältlich noch im Labor herstellbar) wurden Rezeptorautoradiographische Studien an Nierengewebeschnitten des Huhnes durchgeführt. Nach transkardialer Perfusion der narkotisierten Tiere mit RRA-Puffer, wie für die Rezeptorbindungsstudien beschrieben (Kap. 2.2.2.5.3), erfolgte die rasche Präparation der unfixierten Nieren. Segmente der *Divisiones renalis cranialis, medialis* und *caudalis* wurden in pulverisiertem Trockeneis (-78°C) schockgefroren. Im direkten Anschluss wurden im Cryostaten 10 µm dicke Gewebeschnitte bei -23°C Kammertemperatur auf vorgekühlten, mit 0,5 % Gelatine/0,05 % Chromalaun beschichteten Objektträgern aufgenommen, um eine gute Adhäsion der Schnitte auf dem Objektträger (OT) zu gewährleisten. Die Beschichtung der Objektträger erfolgte zuvor durch eine 10 min Inkubation in einer 0,5 % Gelatine-/0,05 Chromalaun-Lösung bei 60°C mit anschließender Trocknung im Wärmeschrank für eine Stunde bei 60°C. Zur vollständigen, milden Elimination von in den Gewebeschnitten vorhandener Feuchtigkeit wurden die auf den OT haftenden Schnitte über Nacht bei 4°C in einem Exsikkator unter Vakuum schonend gefriergetrocknet.

Zur Durchführung der Rezeptorautoradiographie wurden die eiskalten OT mit anherierten Gewebeschnitten bei 37°C für 2 sec angewärmt und einer Präinkubation in 0,2 % BSA-haltigem RRA-Puffer für 20 min bei RT unterzogen (Abb. 12a-c). Ziel der Präinkubation war die Rehydrierung der gefriergetrockneten Schnitte sowie die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für [<sup>3</sup>H]AVP im Gewebe. In der anschließenden Inkubation wurden die Schnitte mit 3,0 nM/L [<sup>3</sup>H]AVP inkubiert. Die Markierung spezifischer sowie möglicher unspezifischer Bindungsstellen wird als Gesamtbindung (GB) bezeichnet. Zur Ermittlung der unspezifischen Bindung (NSB) des Radioliganden wurden serielle Folgeschnitte mit 3,0 nM/L Radioligand in der Gegenwart von 10<sup>-6</sup> M/L unmarkiertem; vogelspezifischem AVT inkubiert = NSB (Abb. 12d). Die Inkubation zur Ermittlung von GB und NSB wurde durch Überschichten der pro OT zwei Nierenschnitte mit 200 µl RRA-Puffer inkl. 0,01 % BSA und Radioliganden (GB) sowie 10<sup>-6</sup> M/L an unmarkiertem AVT (NSB) für 40 min bei RT durchgeführt. Nach Inkubation wurde jeder OT für 3 x 2 min zur Elimination von ungebundenem [<sup>3</sup>H]AVP und AVT in eiskaltem RRA-Puffer gewaschen und letztlich



**Abb. 12 :** Schematisierter Aufbau des Autoradiographiestandes.

[a] luftdichte Boxen mit Objektträgern (OT) auf Trockeneis; [b] Wärmeplatte für OT (37°C), [c] OT-Glasgestelle für die Präinkubation, [d] Wanne und Aluminiumträger für die Inkubation der OT (Nierenschnitte) mit  $[^3\text{H}]\text{AVP}$ , [e] OT-Glasgestelle in Eis bei 2°C für 3 x Waschvorgang der OT (mit Gesamtbindung (oben) und unspezifischer Bindung in Gegenwart von  $10^{-6}$  M/L AVT (unten), [f] Kieselgel-Säulen zur Trocknung der Druckluft, [g] Kältefälle mit Trockeneis gekühltem Aceton, [h] Ventilatorstation. Modifiziert nach Müller und Gerstberger [1994].

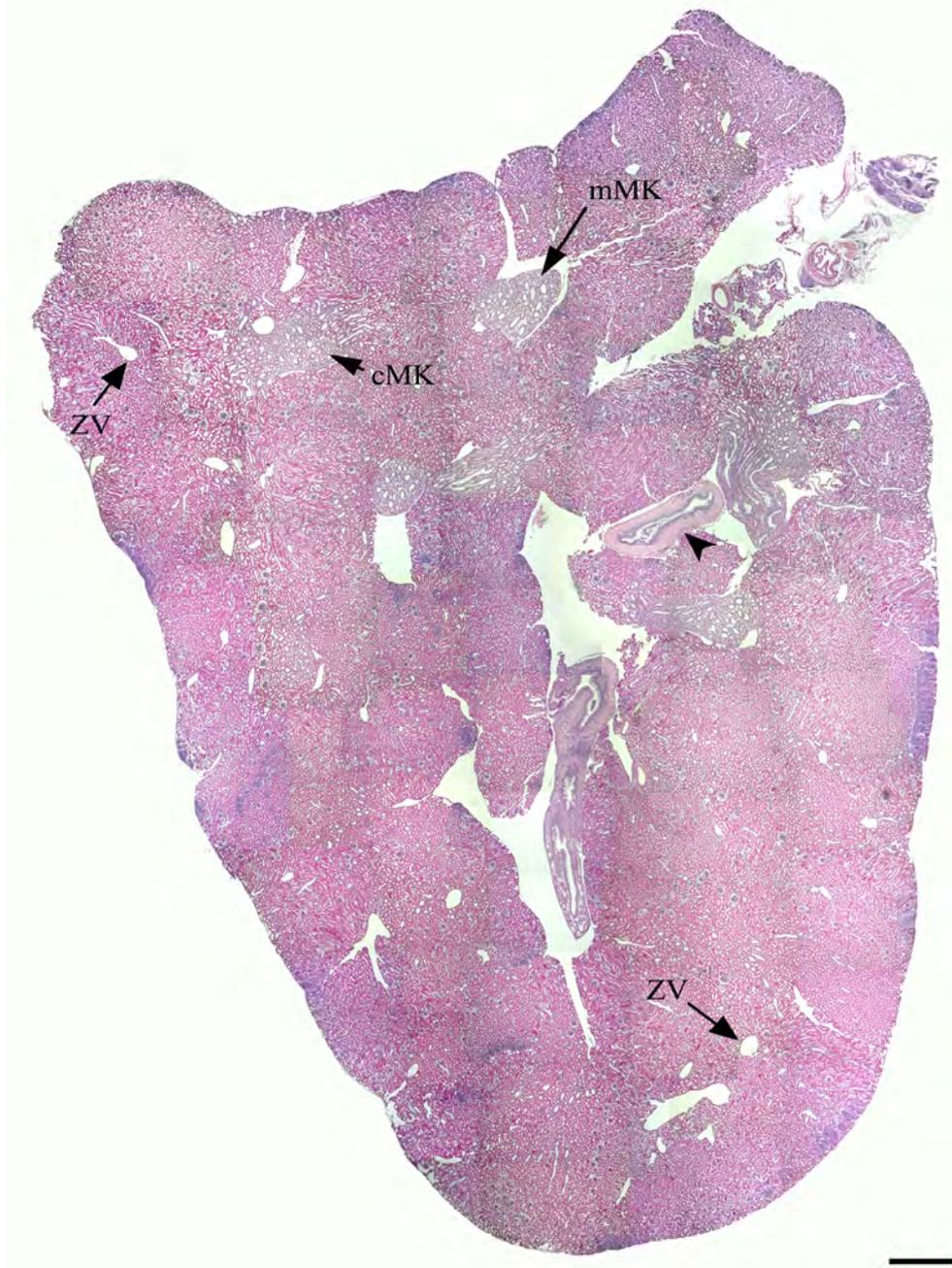
durch kurzes Eintauchen in *Aqua bidest.* (2°C) von Puffersalzen befreit (Abb. 12e). Anschließend wurden die Gewebeschnitte unter einem mit Aceton/Trockeneis gekühlten und mit Kieselgel entwässerten Luftstrom getrocknet sowie einem Ventilator exponiert (Abb. 12f-h).

Die OT mit adherierten, trockenen Nierenschnitten wurden unter Gebläsetrocknung auf Fotokarton aufgeklebt, in einer Dunkelkammer mit einem Tritium-sensitiven Spezialfilm überlagert und in einer Röntgenkassette lichtdicht für 6 - 8 Wochen bei 4°C exponiert. Die Filmentwicklung mit dem Ultrafin Plus System wurde bei absoluter Dunkelheit mit dreiminütiger Inkubation in der Entwickler- sowie sieben-minütiger Inkubation in der Fixierlösung ausgeführt.

## 3. KAPITEL Ergebnisse

### 3.1. Histomorphologie der Hühnerniere : HE-Färbung

Um die immunhistochemisch in Kryostatschnitten der Hühnerniere nachzuweisende Lokalisation und AVT-induzierte Translokation des Wasserkanals AQP-2 (Kap. 3.2 und 3.3) histomorphologisch differenzieren zu können, wurde zunächst an mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Paraffinschnitten des Nierengewebes (4 µm) die komplexe Cytoarchitektur der Hühnerniere erarbeitet und dargestellt. Aus histologischer Sicht ließ sich die Vogelniere in Nierenlappen unterteilen, wobei die einzelnen *Lobi renales*, durch dünne Bindegewebssepten voneinander getrennt, wiederum in pilzkörperförmige Nierenläppchen (*Lobuli renales*) unterteilt waren. Jedes Läppchen setzte sich aus einer Rindenzone (*Cortex renalis*) und einer Markzone (*Medulla renalis*) zusammen, die räumlich gegeneinander versetzt angeordnet waren, so dass bei jeglicher horizontaler Schnittebene durch eine der drei *Divisiones renalis* der Gesamtniere zahlreiche „Pilzkörper“ in jeweils verschiedenen Ebenen angeschnitten wurden (Abb. 13). So fanden sich in jedem Anschnitt mehr oder weniger zirkuläre Markinseln auf corticaler (cMKs) bzw. medullärer Ebene (mMKs), umgeben von Rindenbezirken mit jeweils einer zentralen Vene (*ZV = V. intralobularis*). Als cMK wurde dabei derjenige Bereich eines Markkegels bezeichnet, der sich am Übergang zum *Cortex renalis* befand (Abb. 13). Im Bereich des *Cortex renalis* bzw. des cMKs eines jeden *Lobulus* fanden sich peripher quer und längs angeschnittene Sammelrohre der MT-Nephronen (= LN-Nephronen) sowie proximale Tubuli (PTs) im Querschnitt (Abb. 13; Abb. 14A, B). Im Gegensatz dazu lag der medulläre Markkegel (mMK), der die eigentliche Markzone darstellte, weiter distal im sich verjüngenden Teil des *Lobulus renalis*. Er enthielt die Henleschen Schleifen (HSs) der marknahen MT-Nephronen, die *Vasa recta* und die medullären Sammelrohre (mSRs) (Abb. 13; Abb. 14C). Innerhalb der Markkegel verliefen die mSRs longitudinal und vereinigten sich in ihrem proximodistalen Verlauf zu den größeren Ästen des *Ureter*. Der *Ramus uretericus secundarius* (Abb. 13) nimmt bekanntermaßen den Urin eines *Lobus renalis* auf. Der Ureter wies eine innere longitudinale und eine äußere zirkuläre, glatte Muskelschicht auf. Sein bis zu 40 µm dickes, säulenartiges Epithel enthielt Mukus sezernierende Zellen.



**Abb. 13 :** Querschnitt durch die *Divisio renalis medialis* der dreilappigen Hühnerniere, HE-Färbung.

Ein *Lobulus renalis* besteht aus einer Rindenzone (*Cortex renalis*) und einer Markzone (*Medulla renalis*). Sowohl die corticalen Markkegel (cMKs) als auch die medullären Markkegel (mMKs) werden als kleinflächige Markinseln von Zonen des Rindengewebes umgeben. Die cMKs finden sich am Übergang zum *Cortex renalis*, die mMKs liegen im sich verjüngenden Teil eines *Lobulus renalis*. Die jeweils abführende *V. intralobularis* (ZV) verläuft in proximodistaler Richtung zentral im zugehörigen *Lobulus renalis*. Die Pfeilspitze markiert einen Ureterast. Das Gesamtbild wurde aus 93 Einzelbildern zusammengesetzt. Der *Cortex renalis* ist in Abb. 14A, der cMK sowie der mMK in Abb. 14B und C vergrößert dargestellt.

Der Eichbalken ist 800 µm lang.

In der Niere des Huhnes waren, den beiden Nephrontypen entsprechend, die strukturell unterschiedlichen Glomerula der MT- sowie RT-Nephronen zu erkennen. Im Bereich des *Cortex renalis* eines *Lobulus* waren RT-Glomerula ring- bis hufeisenförmig um die jeweils zentrale *V. intralobularis* (ZV) angeordnet (Abb. 13; Abb. 14A). Die am Nierenpol der RT-Glomerula entspringenden proximalen Tubuli (PTs) waren vorwiegend in der Lappchenperipherie anzutreffen, wohingegen die distalen Tubuli (DTs) in hoher Dichte zentral, in direkter Nähe zur *V. intralobularis* angeordnet waren und sich in ihrem weiteren Verlauf in unmittelbarer Nachbarschaft zu den corticalen Sammelrohren befanden, in welche Sie einmündeten (Abb. 14A).

Die peripher um den *Lobulus renalis* ziehenden, corticalen Sammelrohre vereinigten sich und bildeten am sich verjüngenden Teil des pilzförmigen *Lobulus* ein konisches Bündel, welches Richtung *Medulla renalis* zog. Dieser stielartige Gewebebereich stellte die Markzone des *Lobulus renalis* dar. Es konnte je nach Lokalisation und des damit verbundenen unterschiedlichen histologischen Aufbaus zwischen dem corticalen (Abb. 14B) und dem medullären Markkegel (Abb. 14C) unterschieden werden. Für den cMK charakteristisch, waren in dessen Randbereich vor allem corticale, teilweise auch schon medulläre Sammelrohre in ihrem Querschnitt, manchmal auch Längsschnitt dargestellt (Abb. 14B). Im Zentrum eines cMK verliefen neben den Sammelrohren auch noch zahlreiche kleinlumige DTs sowie vereinzelt PTs und die *Vasa recta* (Abb. 14B). Der Durchmesser eines Markkegels im rindennahen Bereich betrug 0,2 - 0,5 mm; das Epithel der etwa 20 Sammelrohre pro Markkegel nahm in seiner Zellhöhe von durchschnittlich 12 auf ca. 30  $\mu\text{m}$  zu.

Aufgrund der septalen Abgrenzung der einzelnen *Lobuli renales* gegeneinander ließen sich medulläre Markkegel (mMKs) als runde, ovoide oder trianguläre Strukturen leicht vom Bereich der cMKs abgrenzen (Abb. 13; Abb. 14C). Ein mMK enthielt neben den medullären Sammelrohren einige DTs, die Henleschen Schleifen der MT-Nephronen sowie die *Vasa recta* (Abb. 14C). Die Henleschen Schleifen ließen sich histomorphologisch in einen absteigenden dünnen Teil (*Pars descendens ansae*) mit einem Durchmesser von ca. 10 - 15  $\mu\text{m}$  und einen aufsteigenden, dickeren Teil (*Pars ascendens ansae*) mit einem Durchmesser von 20 - 40  $\mu\text{m}$  unterteilen. Innerhalb des mMK gingen die mSRs ineinander über, um einen einzigen langen Ureterast zu formen, welcher den MK an der Spitze verließ.

Sowohl die Größe als auch die Komplexität des mMK nahm in Richtung Markkegelspitze ab. Die Sammelrohre zeigten je nach Lokalisation starke Unterschiede in der Höhe des Epithels. So lag im Bereich perilobulärer, corticaler Sammelrohre eine relativ geringe Zellhöhe vor; im weiteren Verlauf nahm die Epitheldifferenzierung zu, und in der Zone der medullären Sammelrohre fand sich ein hochprismatisches Epithel.

Als kleinste, funktionelle Einheit der Hühnerniere dient das RT- bzw. MT-Nephron, welches sich jeweils aus dem Nierenkörperchen = Glomerulum (*Corpusculum renis*) und dem daran anschließenden Tubulusapparat zusammensetzt (Abb. 15). Das Glomerulum wurde im Wesentlichen von je nach Typus (RT, MT) mehr oder weniger differenzierten Kapillarschlingen sowie der Bowmannschen Kapsel (*Capsula glomerularis*) gebildet (Abb. 15A-C). Mesangialzellen fanden sich vor allem in der Nähe des Gefäßpols der MT-Glomerula sowie deren Zentrum (Abb. 15B). Der juxtaglomeruläre Apparat, gut zu erkennen für das MT-Nephron der Abb. 15B, bestand aus den Zellen der *Macula densa*, extraglomerulären Mesangialzellen sowie den granulären, epitheloiden Zellen der afferenten Arteriole (nicht dargestellt). Bei der *Macula densa* handelt es sich um eine Epithelzellplatte im Bereich der Kontaktstelle von DT und Gefäßpol des Glomerulum. Die Größe der Epithelzellplatte maß

**Abb. 14 : Glomerulo-tubuläre Strukturen des *Cortex renalis*, des corticalen und medullären Markkegels.**

[A] : *Cortex renalis* : Hufeisenförmige Anordnung der RT-Glomerula um die zentrale Vene (ZV) (*V. intralobularis*) mit jeweiliger Anlagerung eines distalen Tubulus (*Macula densa*) (Pfeile). Zentrifugal der RT-Glomerula sind corticale Sammelrohre lokalisiert (eingezogener Pfeilkopf).

Die Bildtafel besteht aus 19 Einzelbildern.

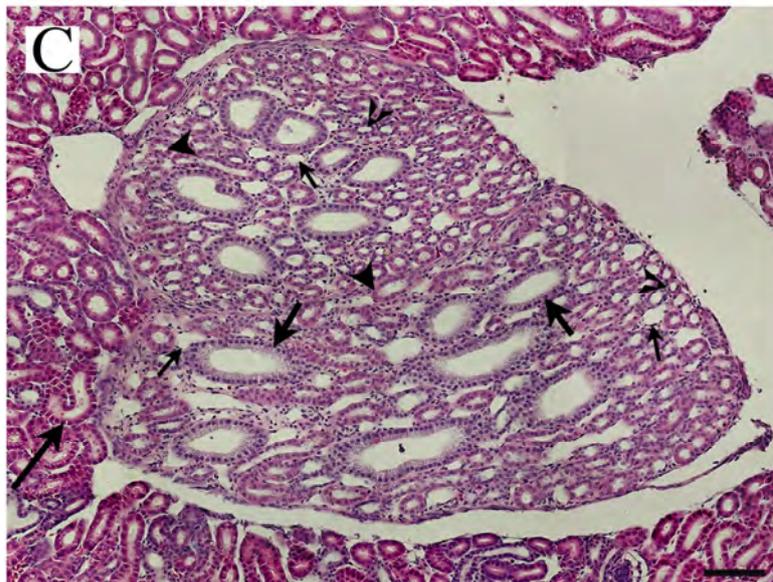
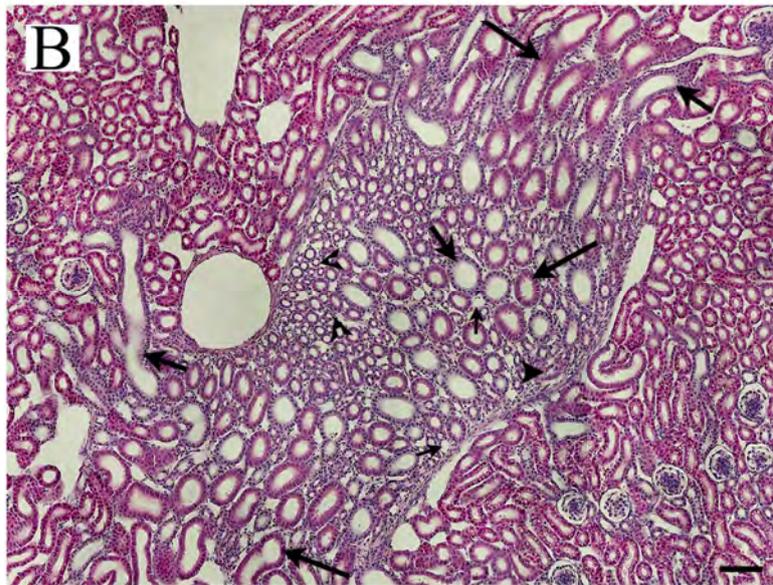
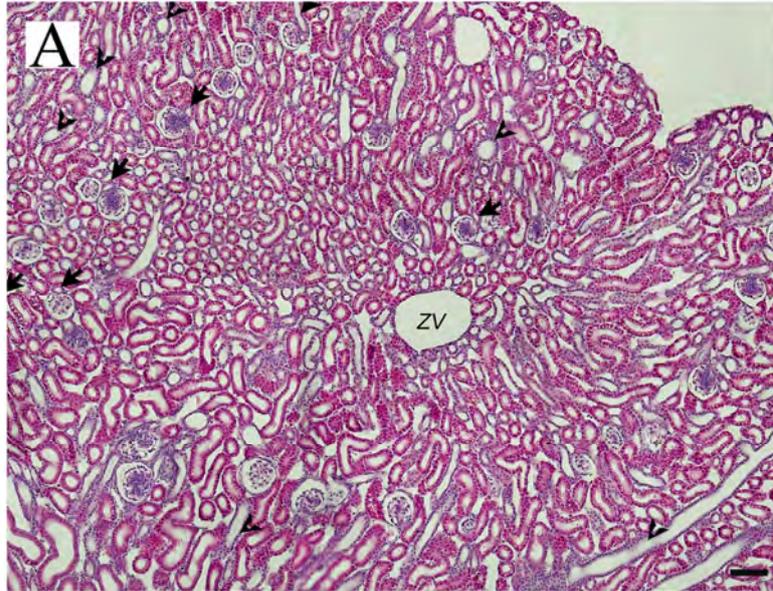
[B] : **Corticaler Markkegel (cMK)** : Im zentralen Bereich des cMK befinden sich quer getroffene proximale Tubuli (PT) (langer Pfeil), Henlesche Schleifen (eingezogener Pfeilkopf), *Vasa recta* (dünner Pfeil), distale Tubuli (DT) (Pfeilkopf) und zahlreiche corticale Sammelrohre (kleiner Pfeil). Die peripheren Komponenten des cMK (rechts oben, links unten) werden durch longitudinal angeschnittene PTs (langer Pfeil) und corticale Sammelrohre (kurzer Pfeil) gebildet.

Die Bildtafel besteht aus 41 Einzelbildern.

[C] : **Medullärer Markkegel (mMK)** : Der mMK besteht aus Henleschen Schleifen der MT-Nephrene (eingezogener Pfeilkopf), den *Vasa recta* (dünner Pfeil), DTs (Pfeilkopf) sowie zahlreichen großlumigen, medullären Sammelrohren (kurzer Pfeil). PTs (langer Pfeil) befinden sich ausschließlich im benachbarten corticalen Gewebe eines anderen *Lobulus renalis*.

Die Bildtafel besteht aus 30 Einzelbildern.

Der Eichbalken gilt für alle Teilabbildungen und ist jeweils 100 µm lang.



ca. 20 - 25  $\mu\text{m}$  in der Breite und 30 -50  $\mu\text{m}$  in der Länge (Abb. 15B). Die direkte Assoziation des Glomerulum mit seinem DT im Bereich der *Macula densa* konnte auch für die RT-Nephronen nachgewiesen werden (Abb. 14A; Abb. 15C, F). Die MT-Glomerula (Abb. 15B) lagen in den markkegelnahen Bereichen eines *Lobulus renalis* und zeigten für das Huhn mittlere Durchmesser von  $105 \pm 10 \mu\text{m}$ . Die im *Cortex renalis* lokalisierten RT-Glomerula (Abb. 15A, C, F) zeichneten sich durch eine einfachere Struktur und entsprechend geringere Größe mit einem Durchmesser von  $60 \pm 8 \mu\text{m}$  aus.

Die proximalen Tubuli mit einem mittleren äußeren Durchmesser von 35 - 45  $\mu\text{m}$  waren durch ein iso- bis leicht hochprismatisches Epithel charakterisiert, das aus 12 - 15  $\mu\text{m}$  großen Zellen mit rundem, zentral bis zentrobasal gelegenen Zellkern aufgebaut war. Deutlich zu erkennen waren die charakteristisch weiten Zellzwischenräume des lecken Epithels, die aufgrund nur limitiert ausgeprägter *tight junctions* einen parazellulären Transport von Ionen und Wasser ermöglichen (Abb. 15D, E; Abb. 16A - C). Dabei war der zwischen benachbarten Epithelzellen ausgeprägte Zell-zu-Zell Kontakt bei hoher Vergrößerung eindeutig apikal lokalisierbar (Abb. 16B, C). Kennzeichnend für die PTs der Hühnerniere war außerdem die ausgeprägte Bildung einer intrazellulären Vakuole (Abb. 15C - E, G; Abb. 16A), welche meist in der subapikalen Region zahlreicher proximaler Tubuluszellen lokalisiert war (Abb. 16C). Apikal trugen die Epithelzellen einen deutlich ausgebildeten Saum aus 2 - 4  $\mu\text{m}$  langen Mikrovilli (Abb. 16B).

Die distalen Tubuli der Hühnerniere wiesen bei einem Außendurchmesser von ca. 25  $\mu\text{m}$  ein isoprismatisches Epithel mit einer Zellhöhe von 8 - 10  $\mu\text{m}$  und rundem, zentral gelegenen Zellkern auf; apikale Mikrovilli waren nur vereinzelt vorzufinden (Abb. 15F, G; Abb. 16D). Häufig erschien die apikale Zellmembran gegen das Lumen vorgewölbt zu sein (Abb. 16D, E). Mukushaltige Zellen waren nicht vorhanden. In unmittelbarer Nähe zu den zentralen *Vv. intralobulares* machten sich strukturelle Veränderungen der DTs deutlich; unter anderem verschwanden die wenigen apikalen Mikrovilli ganz.

Die corticalen Sammelrohre waren charakterisiert durch ein einschichtiges Epithel, dessen Zellhöhe von den perilobulären Sammelrohrbereichen in Nähe der Läppchenperipherie (Abb. 15C, G) im weiteren Verlauf zum cMK von etwa 12  $\mu\text{m}$  bis auf 20  $\mu\text{m}$  zunahm

(Abb. 15A). Die medullären Sammelrohre wiesen ein hochprismatisches Epithel auf (Abb. 16F, G). Es handelte sich um Mukus sezernierende Zellen mit basal gelegenem, runden Kern und einem apikalen Mikrovillisaum. Man konnte sowohl bei den corticalen als auch bei den medullären Sammelrohren zwischen zwei verschiedenen Zelltypen, den Haupt- und Schaltzellen, unterscheiden. Beide waren von hochprismatischer Konfiguration und wiesen einen meist basal gelegenen, runden Zellkern auf (Abb. 15A; Abb. 16F, G). Die Schaltzellen werden auch als interkalierende Zellen bezeichnet und zeigten einen apikalen Saum kurzer Mikrovilli sowie zahlreiche mikropinozytotische Vesikel im apikalen Zytoplasma, wie aufgrund der Rotfärbung in der HE-Färbung gut zu erkennen war (Abb. 15A; Abb. 16F, G).

**Abb. 15 : Glomeruläre und tubuläre Strukturen der Hühnerniere I.**

[A] : Längs angeschnittenes, corticales Sammelrohr (cSR); die Pfeile verdeutlichen die Position der interkalierenden Schaltzellen. In direkter Umgebung hierzu die Lokalisation mehrerer proximaler Tubuli sowie eines RT-Glomerulum.

[B] : MT-Glomerulum (MT) mit angelagertem distalen Tubulus (DT), bei Ausprägung der *Macula densa* (eingezogener Pfeilkopf). Das markante zentrale Mesangium (Pfeilkopf) sowie das glomeruläre Kapillarnetz (kurzer Pfeil) sind von der Bowmannschen Kapsel umgeben (langer Pfeil).

[C] : RT-Glomerulum (RT) mit Kapillarschlinge (kurzer Pfeil), Bowmannscher Kapsel (langer Pfeil) und subkapsulärem Raum im Bereich des *Cortex renalis*.

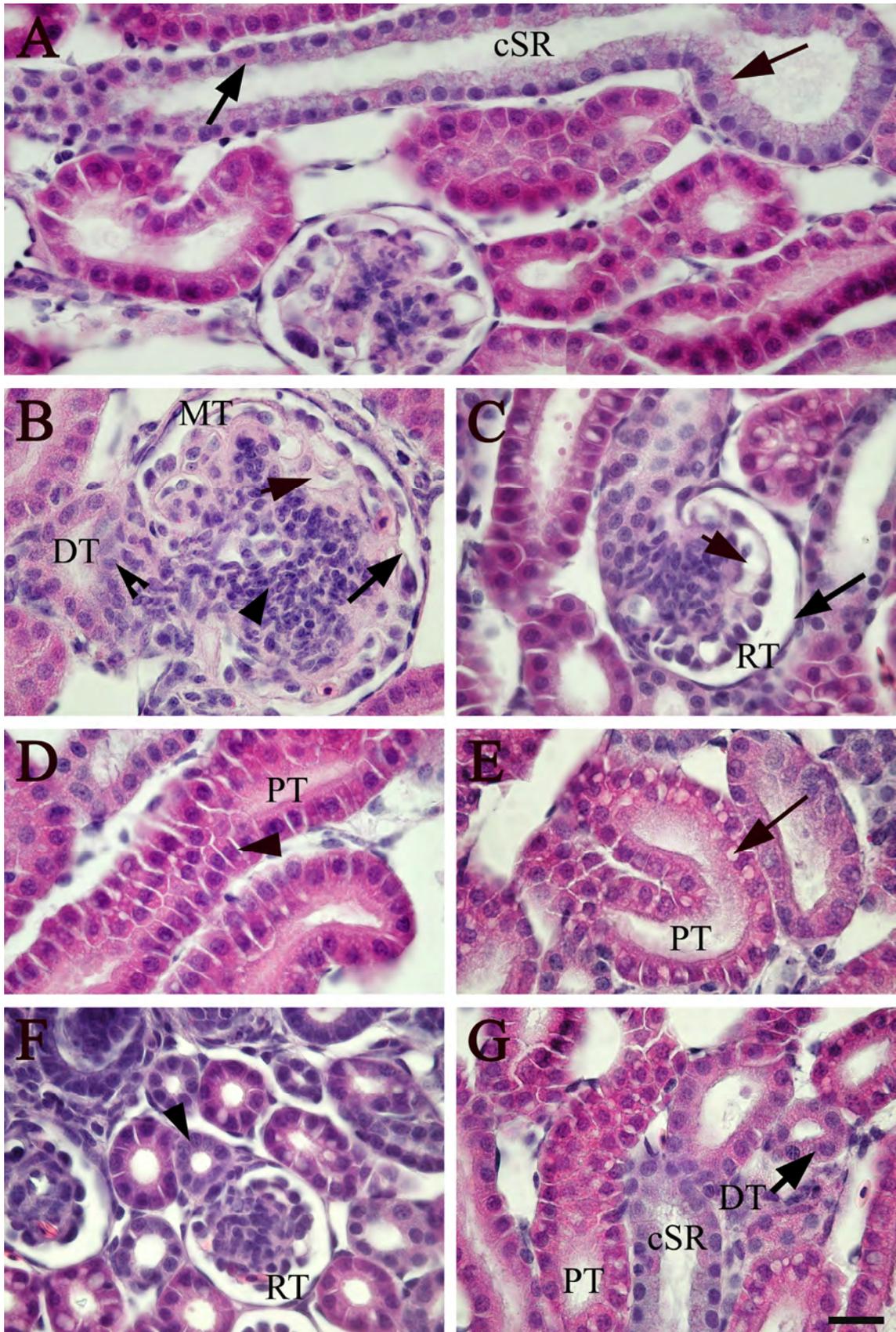
[D] : Längs angeschnittene proximale Tubuli (PT) mit deutlich erkennbarem, hochprismatischem Epithel, Zellgrenzen (Pfeilkopf) und engem Lumen.

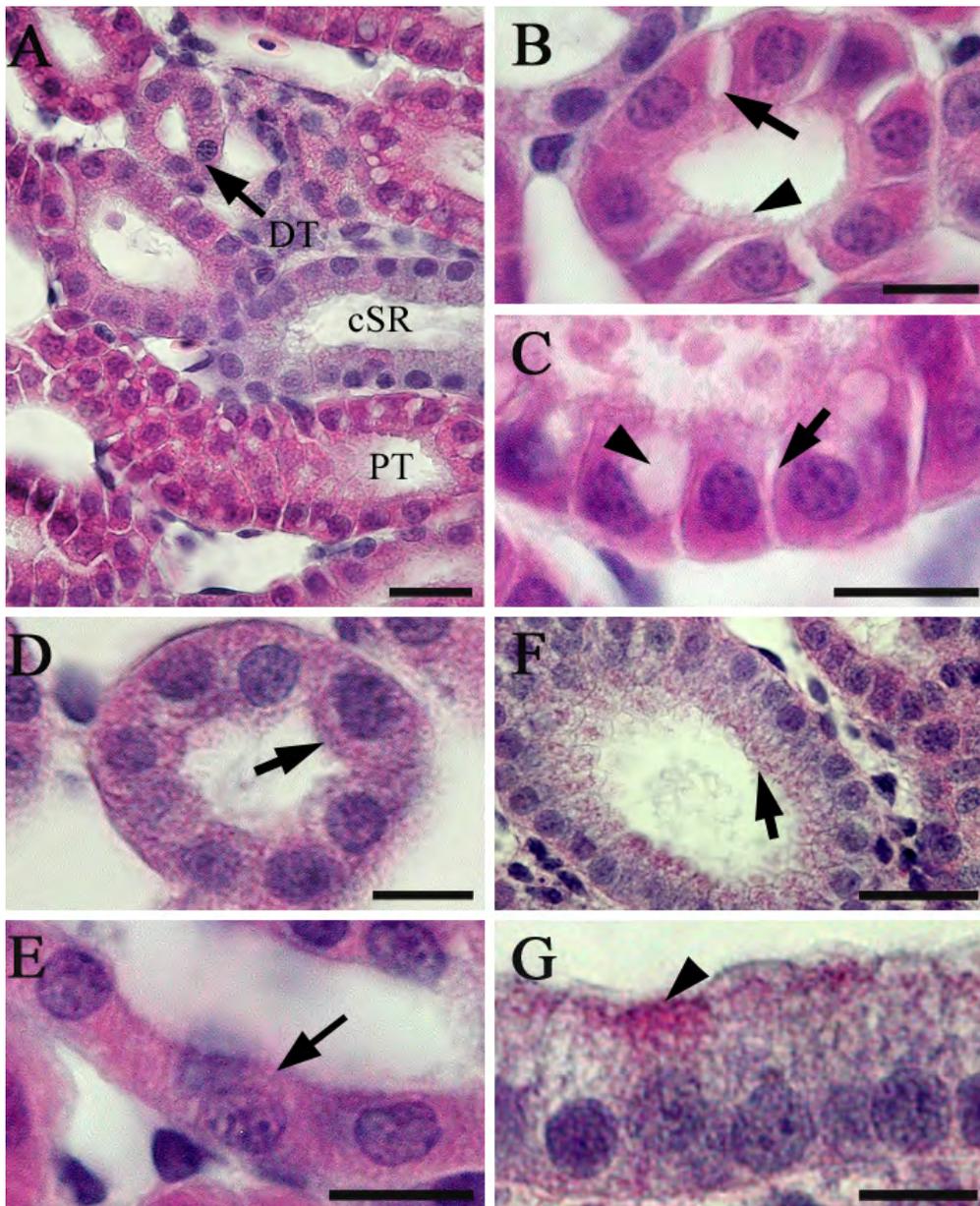
[E] : Quer angeschnittener proximaler Tubulus (PT) mit intrazellulären Vakuolen (Pfeil).

[F] : RT-Glomerulum (RT) mit angelagertem distalen Tubulus (DT) im Bereich des *Cortex renalis* (Pfeilkopf).

[G] : Längs angeschnittener proximaler (PT) und distaler Tubulus (DT) (Pfeil) sowie corticales Sammelrohr (cSR) im Bereich des *Cortex renalis*.

Der Eichbalken gilt für alle Teilabbildungen und ist 25 µm lang.





**Abb. 16 : Glomeruläre und tubuläre Strukturen der Hühnerniere II.**

[A] : Proximale (PT) und distale Tubuli (DT) (Pfeil) sowie ein corticales Sammelrohr (cSR) im Bereich des *Cortex renalis*.

[B] : Quer angeschnittener proximaler Tubulus (PT) mit weiten Zellzwischenräumen (Pfeil) und apikalem Mikrovillisaum (Pfeilkopf).

[C] : Längs angeschnittener proximaler Tubulus (PT) mit hochprismatischem Epithel zeigt deutlich ausgebildete Zellzwischenräume (Pfeil) und intrazelluläre Vakuolenbildung (Pfeilkopf).

[D], [E] : Quer (D) und längs (E) angeschnittene distale Tubuli (DTs) zeigen eine Vorwölbung der apikalen Zellmembran in das Tubuluslumen (Pfeil).

[F], [G] : Quer (F) und längs (G) angeschnittenes medulläres Sammelrohr (mSR) mit interkalierenden Zellen (Pfeilkopf) sowie kurzem, apikalen Mikrovillisaum (Pfeil).

Der Eichbalken ist jeweils 12,5  $\mu\text{m}$  (B - E, G) bzw. 25  $\mu\text{m}$  (A, F) lang.

### **3.2. Immunhistochemischer Nachweis für AQP-2 und CA-II in der Hühnerniere**

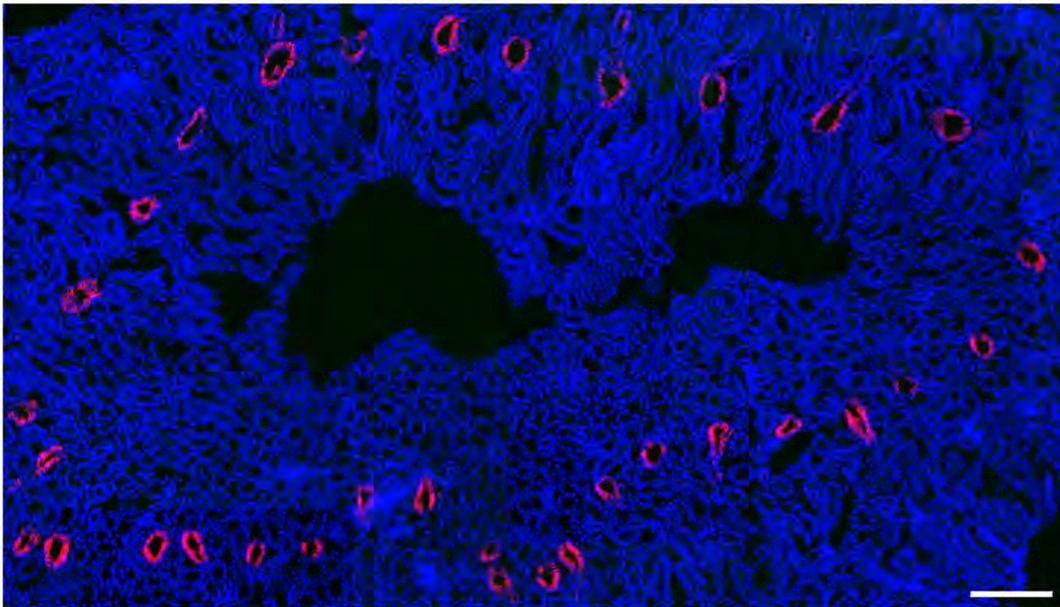
Ein erstes Hauptziel der vorliegenden Arbeit stellte der immunhistochemische Nachweis für die zelluläre Expression des Wasserkanals AQP-2 sowie des Enzyms Carboanhydrase-II (CA-II) in bestimmten tubulären Segmenten der Hühnerniere dar. Um eine histologisch eindeutige Zuordnung der renalen AQP-2 bzw. CA-II spezifischen Immunreaktivität zu determinierten tubulären Substrukturen der RT- bzw. MT-Nephrene machen zu können, erfolgte ein direkter Vergleich immunhistochemisch markierter Gewebsschnitte mit seriellen, Hämatoxylin-Eosin gefärbten Nierenschnitten. Darüber hinaus wurden immunhistochemisch markierte Gefrierschnitte selbst sequentiell mit Hämatoxylin-Eosin gegengefärbt. Da die Antigen-Spezifität der eingesetzten Primärantiseren/-körper das entscheidende Kriterium für die Bindung an das entsprechende Antigen darstellt, wurden Kontrollversuche an ebenfalls seriellen Nierenschnitten durch (A) Weglassen des Primärantiserums/-körpers sowie (B) „Absättigung“ des Antiserums/-körpers mit dem entsprechenden Antigen vor Durchführung des immunhistochemischen Protokolls vorgenommen.

#### **3.2.1. Aquaporin-2 (AQP-2) Expression in der Hühnerniere**

Hinsichtlich des immunhistochemischen Nachweises für die zelluläre Lokalisation von AQP-2 in der Vogelniere unter nicht-stimulierten Kontrollbedingungen sowie nach endogen bzw. exogen induzierter Erhöhung der Plasmakonzentration an AVT wurden zur besseren Veranschaulichung sowohl Übersichts- als auch Detailaufnahmen der Antikörpermarkierten nephronalen Strukturen der Vogelniere sowohl im Bereich des *Cortex renalis* als auch des corticalen (cMK) sowie medullären (mMK) Markkegels angefertigt.

Übersichtsaufnahmen aus dem Bereich des *Cortex renalis* eines Nierenläppchens ließen selektiv für die AQP-2 Expression markierte, tubuläre Strukturen mit einem mittleren Außendurchmesser von 25 µm und klarer Abgrenzung zum unmarkierten Umfeld im histologischen Querschnitt erkennen (Abb. 17). Sie waren in unmittelbarer Nähe zu den zentripetal gelegenen RT-Glomerula lokalisiert und in den vorliegenden histologischen Untersuchungen - ähnlich wie die RT-Glomerula - in einem hufeisen- bis ellipsenbahnähnlichen Verteilungsmuster peripher um die *V. intralobularis* angeordnet, welche im Zentrum des jeweiligen *Lobulus renalis* in proximodistaler Richtung verlief. Der Vergleich zu den unter Kap. 3.1. beschriebenen, HE-gefärbten Paraffinschnitten der Hühnerniere legte die AQP-2

spezifische Markierung corticaler Sammelrohre nahe. Teilbilder der Abb. 19 stellen jeweils AQP-2 markierte tubuläre Einheiten im Bereich des *Cortex renalis* dar, wobei diese sowohl im longitudinalen Verlauf (Abb. 19C) als auch quer geschnitten (Abb. 19D) getroffen sind. Dabei konnte neben einer diffusen Markierung für immunreaktives AQP-2 vor allem im medialen und apikalen Bereich des Zytoplasmas zahlreicher Epithelzellen eine ausgeprägte Antigen-Antikörper Reaktion in der luminalen (= apikalen) Zellmembran einzelner Tubuluszellen detektiert werden (Insets der Abb. 19C, D).



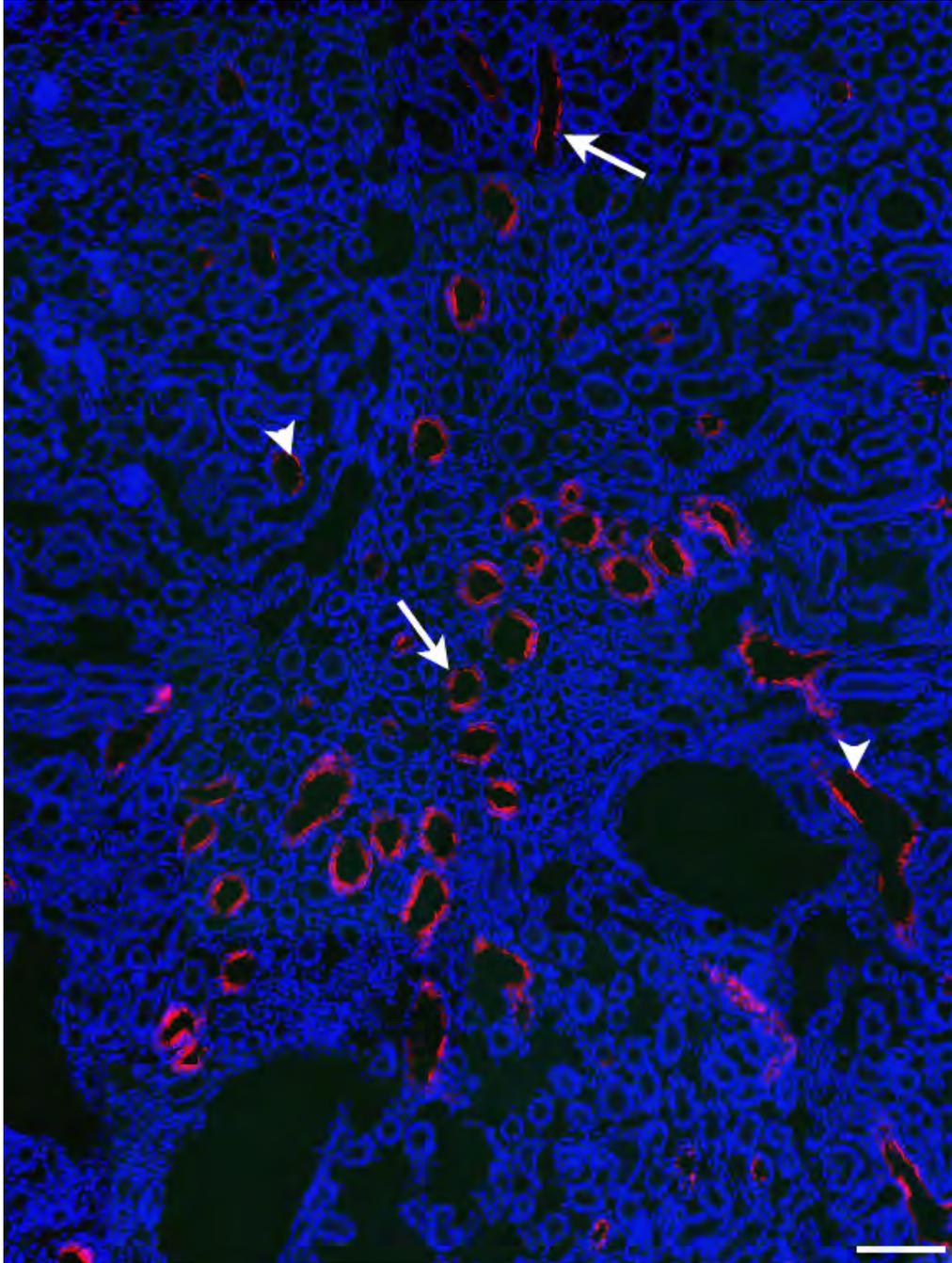
**Abb. 17 :** Darstellung der zytoplasmatischen AQP-2 Immunreaktivität im Bereich des *Cortex renalis* eines Nierenläppchens.

Hufeisen- bzw. ellipsenförmige Anordnung AQP-2 immunpositiver, tubulärer Strukturen (quer geschnitten) im Bereich des *Cortex renalis* eines *Lobulus renalis* der Hühnerniere, mit großer, zentral gelegener *V. intralobularis*. Nachweis der AQP-2 Expression durch Markierung mit affinitätsgereinigtem rabbit anti-rAQP-2 als Primärantikörper und Cy3-gekoppeltem goat anti-rabbit IgG als Sekundärantikörper. Markierung aller Zellkerne mit DAPI.

Die Bildtafel besteht aus 33 Einzelbildern.

Der Eichbalken ist 100 µm lang.

Auch im Übergangsbereich des *Cortex renalis* zum Markkegel, oft als corticale Markkegelzone (cMK) bezeichnet, konnte eine ausgeprägte Immunreaktivität für AQP-2 in tubulären Strukturen mit einem Durchmesser von etwa 25 - 30 µm nachgewiesen werden, welche oft in unmittelbarer Nähe zu großen MT-Glomerula (80 - 110 µm Durchmesser) marknaher Nephrone lokalisiert waren (Abb. 18).



**Abb. 18 :** Darstellung der AQP-2 Expression in einem corticalen Markkegel der Hühnerniere.

Verteilungsmuster von AQP-2 immunpositiv markierten, meist quer geschnittenen, tubulären Segmenten der Hühnerniere im Bereich eines corticalen Markkügels (cMK) (Pfeil), sowie im Übergangsbereich zur Zone des *Cortex renalis* (Pfeilköpfe), in direkter Nähe zu MT-Glomerula. Nachweis der AQP-2 Expression durch Markierung mit affinitätsgereinigtem rabbit anti-rAQP-2 als Primärantikörper und Cy3-gekoppeltem goat anti-rabbit IgG als Sekundärantikörper. Markierung aller Zellkerne mit DAPI.

Die Bildtafel besteht aus 43 Einzelbildern.

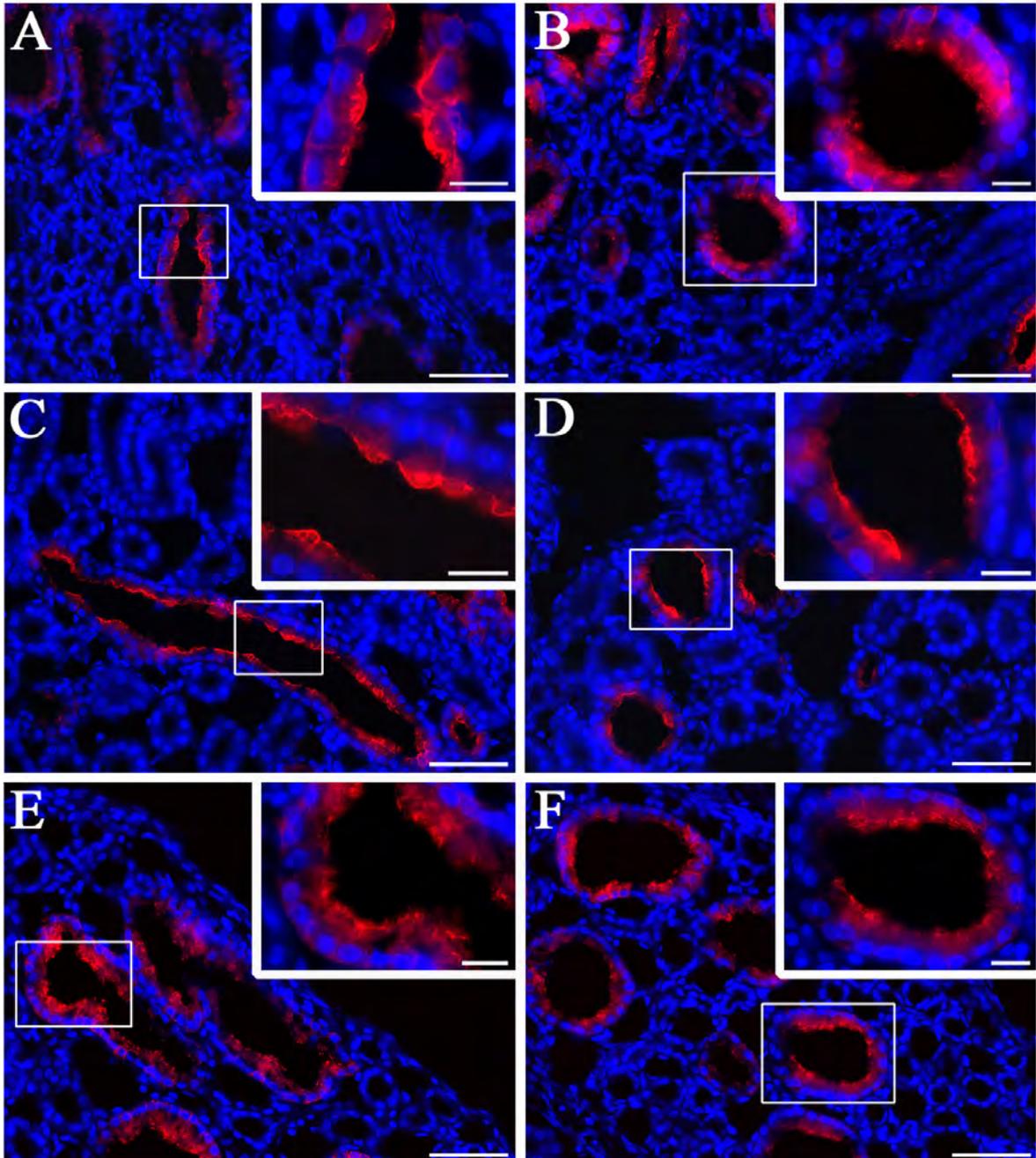
Der Eichbalken ist 50  $\mu$ m lang.

Vergleichbar zu der Situation im *Cortex renalis* wiesen die meisten Epithelzellen der putativen corticalen Sammelrohre der cMKs eine AQP-2 positive immunreaktive Markierung auf. So ließen sich sowohl in Längsschnitten als auch im Querschnitt 80 - 90 % der Epithelzellen der Sammelrohre eindeutig als AQP-2 exprimierende Zellen darstellen (Abb. 19 A, B), wobei in unmittelbarer Umgebung des basal gelegenen Nucleus zumeist keine spezifische Immunfluoreszenz detektierbar war, bei nahezu uniformer - und wiederum diffuser - Verteilung AQP-2 spezifischer Expression im supranukleären Bereich des medioapikalen Zytoplasmas. Dabei zeigte sich schon in diesen alleinig dem qualitativen AQP-2 Nachweis dienenden Lokalisationsstudien, dass in Nierenpräparationen von Hühnern mit erhöhter Konzentration an zirkulierendem AVT eine gesteigerte immunhistochemische AQP-2 Markierung in der luminalen Zellmembran vorlag (Insets der Abb. 19A, B). Bei genauer Analyse der Nierenschnitte konnte klar verzeichnet werden, dass 10 - 20 % der hochprismatischen Epithelzellen gar keine oder lediglich eine sehr geringe Immunreaktivität für den Wasserkanal aufwiesen, wahrscheinlich zurückzuführen auf die interkalierende Lokalisation AQP-2 immunnegativer Schaltzellen bzw. nicht AQP-2 exprimierender Hauptzellen.

Übersichtsaufnahmen medullärer Markkegel (mMKs) glichen in etwa denen der cMKs. Vergleichbar den Expressionsmustern für den *Cortex renalis* sowie die cMKs konnte für mehr als 80 % aller Epithelzellen der mMKs eine zytosolische sowie teilweise auch membranständige Lokalisation des Wasserkanals AQP-2 demonstriert werden (Abb. 19E, F). Durchgehend konnte somit in (vermutlich) Hauptzellen corticaler und medullärer Sammelrohre der Hühnerniere eine supranukleäre AQP-2 Expression mit Beteiligung sowohl des Zytosols als auch der apikalen PM aufgezeigt werden, wobei sich bei Tieren mit erhöhtem Plasma-AVT eine markantere AQP-2 Lokalisation im Bereich der apikalen Zellmembran verifizieren ließ.

### ***3.2.2. Spezifität des gegen AQP-2 gerichteten, polyclonalen Primäntiserums***

Zum Nachweis der Spezifität des gegen AQP-2 der Ratte gerichteten, polyclonalen Primäntikörpers wurden anhand von Parallelschnitten des Nierengewebes der Hühner Negativkontrollen angefertigt (Abb. 20). Dabei wurde entweder das rAQP-2 spezifische, polyclo-



**Abb. 19 :** Darstellung der zytoplasmatischen und membranständigen AQP-2 Expression in *Cortex renalis*, cMKs und mMKs der Hühnerniere.

Tubuläre Segmente (vermutlich Sammelrohre) aus dem Bereich des *Cortex renalis* (C, D), eines corticalen Markkegels (cMK) (A, B) sowie eines medullären Markkegels (mMK) (E, F), jeweils im Längsschnitt (A, C, E] bzw. Querschnitt (B, D, F] mit immunpositiver Markierung zahlreicher Epithelzellen (vermutlich Hauptzellen). Die Insets zeigen den jeweils markierten Bereich in höherer Auflösung. Nachweis der AQP-2 Expression durch Markierung mit affinitätsgereinigtem rabbit anti-rAQP-2 als Primärantikörper und Cy3-gekoppeltem goat anti-rabbit IgG als Sekundärantikörper. Markierung aller Zellkerne mit DAPI.

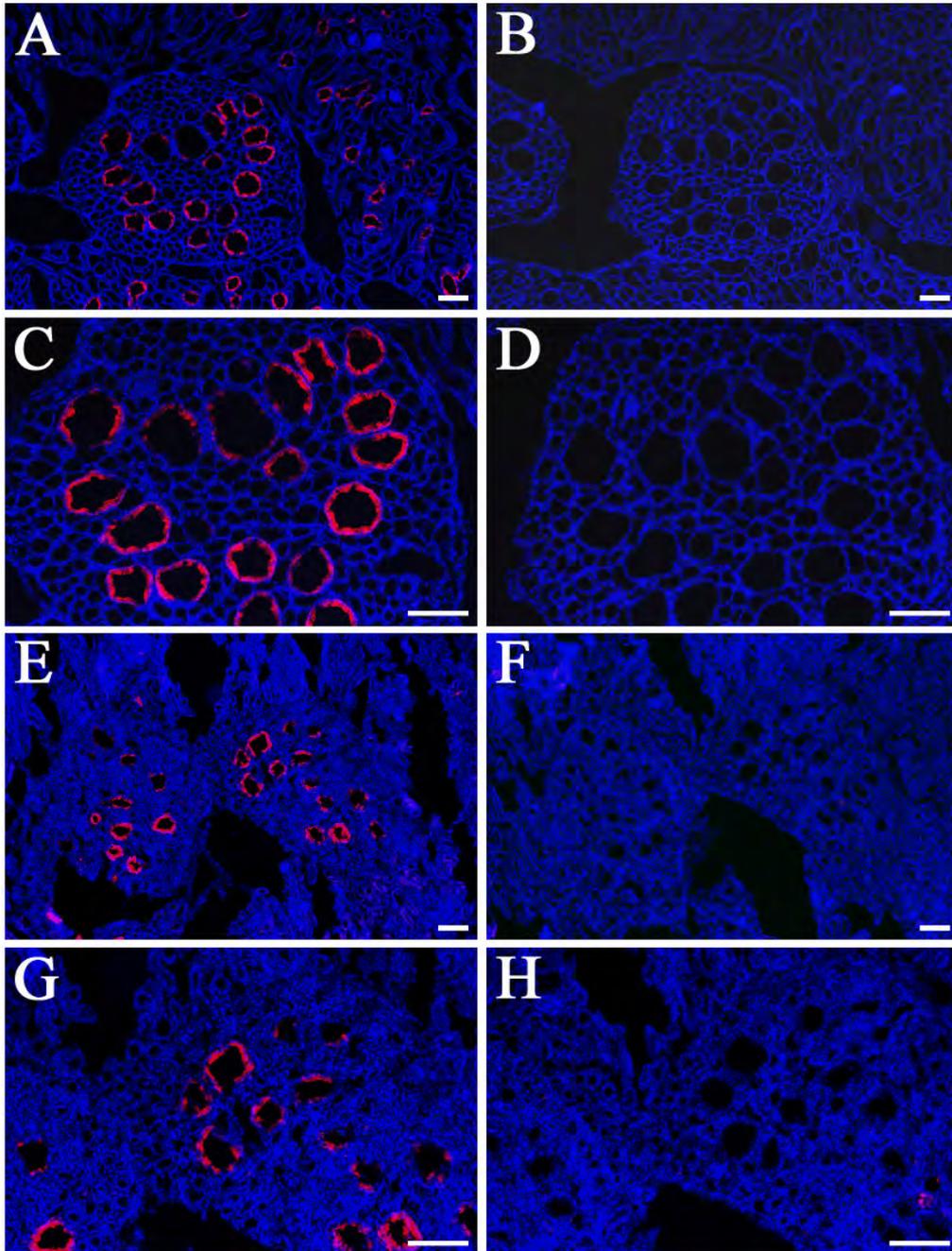
Die Eichbalken der Abbildungen sind jeweils 50 µm, diejenigen der Insets 12,5 µm lang.

nale Antiserum im Rahmen der Inkubationsreaktion weggelassen oder mit dem für die Immunisierung eingesetzten Oligopeptid-Antigen (C)RQSVELHSPQSLPRGSKA in einer Präinkubation abgesättigt. In ersterem Fall eventuell noch nachweisbare Fluoreszenz-Signale wären folgerichtig auf unspezifische Markierungen durch den Cy3-gekoppelten sekundären Antikörper zurückzuführen, im zweiten Fall auf die unspezifische Erkennung anderer Polypeptide / Proteine im Nierengewebe durch das Primärantiserum.

Die Abbildungen 20A und C zeigen für AQP-2 immunpositiv markierte tubuläre Strukturen aus dem Bereich eines medullären Markkegels - vermutlich Sammelrohre darstellend - sowie im angrenzenden corticalen Gewebe für AQP-2 Expression markierte, putative corticale Sammelrohre. Die vor dem immunhistochemischen Versuchsansatz durchgeführte „Absättigung“ des primären, AQP-2 spezifischen Antiserums mit kommerziell erhältlichem, gereinigtem Antigen in einem Verhältnis von 10 µg Antigen pro 1 µg Antikörper (etwa äquimolares Verhältnis) bedingte eine vollkommene Unterbindung des immunhistochemischen Nachweises einer AQP-2 spezifischen Immunfluoreszenz (Abb. 20B, D) in allen auf diese Weise behandelten Nierengewebsschnitten. Ein vergleichbares Ergebnis ergab sich auch für alle Bereiche der Hühnerniere, wenn das primäre, rAQP-2 spezifische Antiserum nicht in den experimentellen Inkubationsansatz mit aufgenommen wurde. So zeigt Abb. 20E für AQP-2 immunmarkierte tubuläre Strukturen im Bereich eines corticalen Markkegels, welcher in Abb. 20G vergrößert dargestellt ist. „Weglassen“ des AQP-2 spezifischen Primärantikörpers bewirkte, dass keine weiteren Fluoreszenz-Signale mehr detektierbar waren (Abb. 20F, H).

### ***3.2.3. Identifikation AQP-2 exprimierender, tubulärer Strukturen der Hühnerniere***

Um die Lokalisation des AQP-2 histologisch eindeutig zu verifizieren, wurden für jedes der untersuchten Tiere einige der für die immunhistochemische Auswertung herangezogenen Nierenschnitte nach erfolgter Auswertung mit HE gegengefärbt (Abb. 21). Aufnahmen im Bereich der corticalen Markkegel sowie des angrenzenden *Cortex renalis* ließen erkennen, dass die AQP-2 immunpositiven tubulären Strukturen corticale Sammelrohre mit einem Außendurchmesser von etwa 25 µm, bestehend aus einem isoprismatischen Epithel und zentral gelegenen Zellkernen, darstellten (Abb. 21A - D). Bei höherer Vergrößerung



**Abb. 20 : Immunhistochemischer Nachweis der Antigenpezifität des für AQP-2 spezifischen Primäntiserums.**

Immunhistochemische Darstellung renaler AQP-2 Expression aus dem Bereich eines medullären (A - D) bzw. corticalen Markkegels (E - H) der Hühnerniere. Die rechte Bildhälfte zeigt einen seriellen Gewebsschnitt zur jeweiligen linken Bildhälfte nach „Absättigung“ des rAQP-2 Antiserums mit dem gereinigten Antigen (B, D versus A, C) bzw. „Weglassen“ des AQP-2 spezifischen Primäntiserums (F, H versus E, G). (C, D) und (G, H) repräsentieren Vergrößerungen von (A, B) respektive (E, F). Nachweis der AQP-2 Expression durch Markierung mit affinitätsgereinigtem rabbit anti-rAQP-2 als Primäntikörper und Cy3-gekoppeltem goat anti-rabbit IgG als Sekundäntikörper. Markierung aller Zellkerne mit DAPI.

Die Eichbalken sind alle 50 µm lang.

wird deutlich, dass die teilweise weitlumigen Nephronstrukturen mit markanten immunhistochemischen Signalen für die AQP-2 Expression corticale Sammelrohre darstellten (Abb. 21E -H). Darüber hinaus ließen sich die interkalierenden Schaltzellen anhand ihrer typischen Anfärbung mit Hämatoxylin-Eosin eindeutig identifizieren und als AQP-2 immunnegativ bzw. nur sehr schwach positiv klassifizieren (Abb. 21C, D). Immunhistochemische Doppelmarkierungen von perfusionsfixierten Nierenschnitten für die Expression von AQP-2 sowie das Enzym Carboanhydrase II erbrachten den Nachweis der exklusiven CA-II Expression auf hohem Niveau in exakt den AQP-2 defizienten Schaltzellen der corticalen sowie auch medullären Sammelrohre im Bereich der cMKs und mMKS der Hühnerniere (Abb. 21E; 22; 23) (Kap. 3.2.4). Die Hauptzellen der Sammelrohre erwiesen sich dagegen als durchgängig immunhistochemisch negativ für den CA-II Nachweis (Abb. 23A - F). Mittels der HE-Gegenfärbung ist es somit gelungen, die histologischen Strukturen der zuvor immunfluoreszenzmarkierten Schnitte aufgrund bestimmter Charakteristika wie der Ausbildung des Epithels, Lage des Zellkernes, Größe des Außendurchmessers, Vorkommen bestimmter Zelltypen (interkalierende Zellen) und letztendlich typischer Färbung bestimmten Abschnitten der Nephrone zuzuordnen. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in der Niere des Huhnes nahezu alle Hauptzellen sowohl corticaler als auch medullärer Sammelrohre aus den Bereichen des *Cortex renalis*, des corticalen sowie medullären Markkegels den Wasserkanal AQP-2 exprimierten.

**Abb. 21 : Histologische Verifizierung der AQP-2 immunpositiven tubulären Strukturen der Hühnerniere.**

Gegenfärbung von zuvor immunhistochemisch für den Nachweis von AQP-2 (sowie manchmal auch CA-II) vorbehandelten Gewebsschnitten der Hühnerniere mit Hämatoxylin-Eosin zur exakten histologischen Charakterisierung der AQP-2 (und CA-II) exprimierenden Nephronsegmente.

**[A, B] :** Im Bereich eines corticalen Markkegels (cMK) sowie am Übergang zum corticalen Gewebe eines Pilzkörpers exprimieren Epithelzellen corticaler Sammelrohre AQP-2 (Pfeile). Glomerula und proximale Tubuli (PT) erweisen sich als AQP-2 immunnegativ (Pfeilkopf).

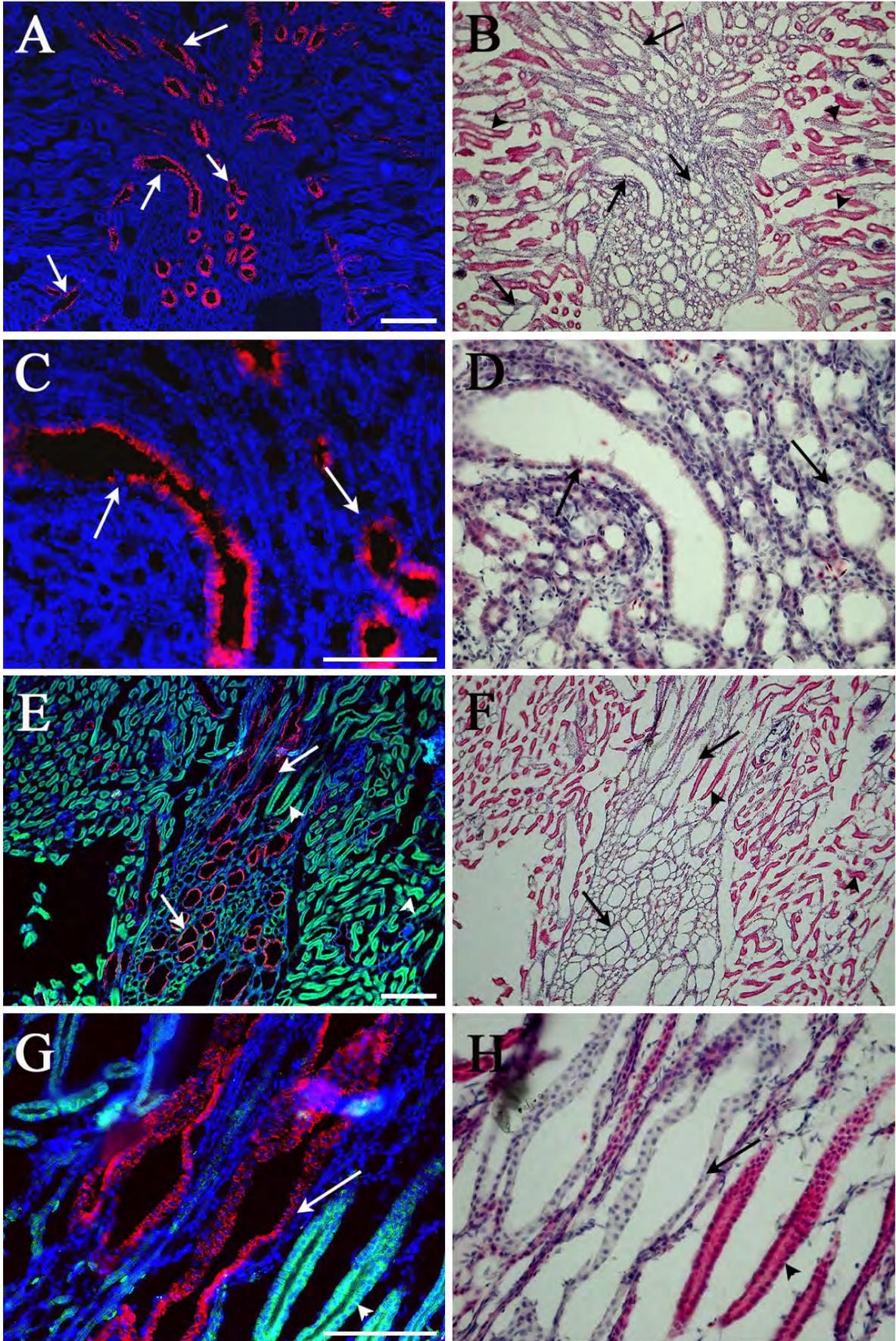
**[C, D] :** Kongruente Ausschnittsvergrößerungen aus den Teilabbildungen **A** und **B**.

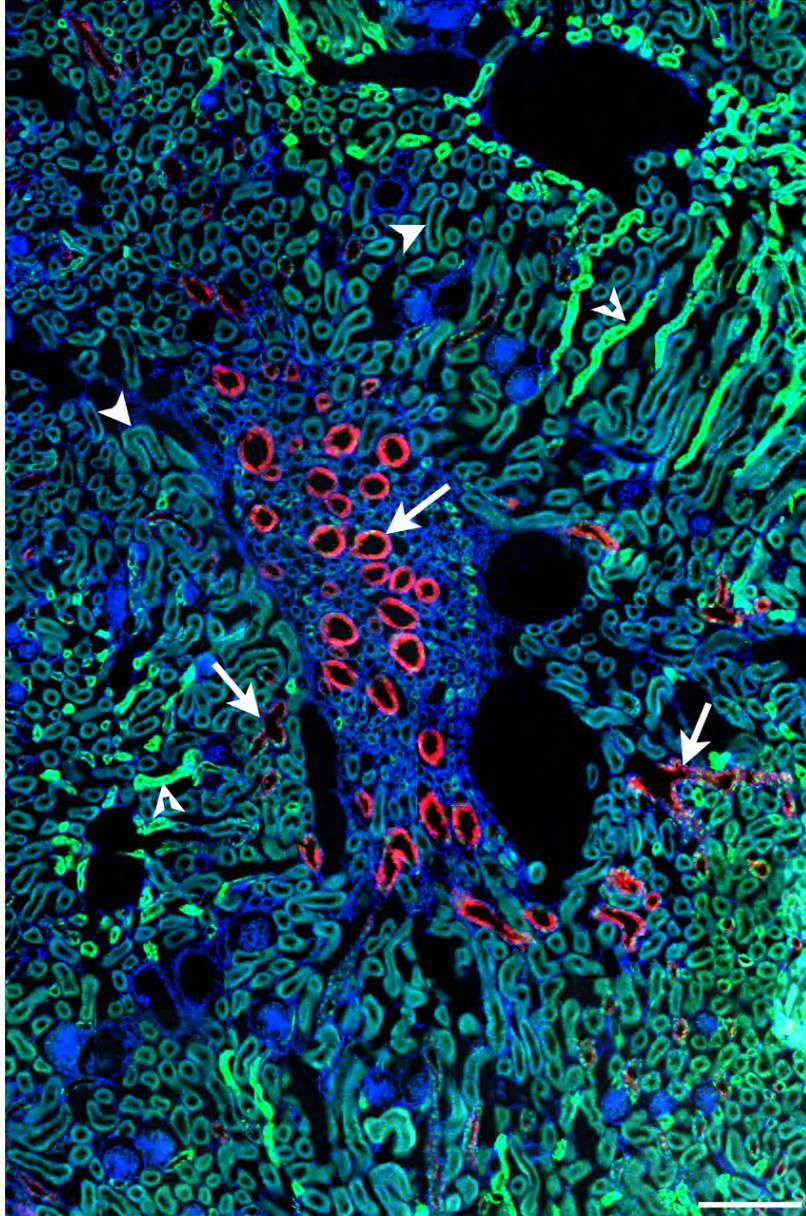
**[E, F] :** Doppelmarkierung eines Nierenschnittes auf der Ebene eines corticalen Markkegels für den immunhistochemischen Nachweis von AQP-2 und CA-II (**E**) sowie nachfolgende HE-Färbung. (**F**). AQP-2 immunpositive corticale Sammelrohre im Bereich des cMK sowie am Übergang zum corticalen Gewebe (Pfeile). Epithelzellen proximaler Tubuli (Pfeilkopf) exprimieren CA-II.

**[G, H] :** Kongruente Ausschnittsvergrößerungen aus den Teilabbildungen **E** und **F**.

Nachweis der AQP-2 Expression durch Markierung mit affinitätsgereinigtem rabbit anti-rAQP-2 als Primärantikörper und Cy3-gekoppeltem goat anti-rabbit IgG als Sekundärantikörper. Nachweis der CA-II Expression durch Markierung mit mouse anti-chCA-II als Primär- und Alexa 488-gekoppeltem goat anti-mouse IgG als Sekundärantikörper. Markierung aller Zellkerne mit DAPI.

Die Eichbalken in A, B, E, und F sind 100 µm, die in C, D, G und H 50 µm lang.





**Abb. 22 : Immunhistochemischer Nachweis der zellulären Expression von CA-II und AQP-2 in der Hühnerniere auf der Ebene eines corticalen Markkegels.**

Im Bereich eines cMK sowie angrenzenden *Cortex renalis* weisen quer geschnittene Sammelrohre AQP-2 Expression in zahlreichen Hauptzellen, CA-II Expression ausnahmslos in interkalierenden Schaltzellen auf (Pfeile). Die tubulären Strukturen im cMK mit starker CA-II Immunreaktivität stellen den dicken aufsteigenden Ast der HS dar. Darüber hinaus zeigen zahlreiche proximale Tubuli (PT) (Pfeilkopf) schwächere, homogen verteilte Immunfluoreszenz-Signale, während distale Tubuli (DT) eine ausgeprägte Immunreaktivität für CA-II demonstrieren (eingezogener Pfeilkopf).

Nachweis der AQP-2 Expression durch Markierung mit affinitätsgereinigtem rabbit anti-rAQP-2 als Primärantikörper und Cy3-gekoppeltem goat anti-rabbit IgG als Sekundärantikörper. Nachweis der CA-II Expression durch Markierung mit mouse anti-chCA-II als Primär- und Alexa 488-gekoppeltem goat anti-mouse IgG als Sekundärantikörper. Markierung aller Zellkerne mit DAPI.

Das Gesamtbild ist aus 89 Bildern zusammengesetzt.

Der Eichbalken beträgt 100µm.

### 3.2.4. Renale Carboanhydrase II (CA-II) Expression

Die Expression der Carboanhydrase II (CA-II) wurde vornehmlich zur Charakterisierung tubulärer Strukturen und somit, wie schon unter Kap. 3.2.3 beschrieben, der Verifizierung der AQP-2 Lokalisation eingesetzt. Anhand der charakteristischen, unterschiedlich stark ausgeprägten CA-II Immunreaktivität für unterschiedliche Struktureinheiten der Hühnerniere - in Übereinstimmung mit Untersuchungen an der Japanischen Wachtel (*Coturnix coturnix japonica*) [Gabrielli *et al.*, 1998, 2000] - ließen sich mehrere histologische Strukturen als CA-II immunpositiv charakterisieren. So zeigten corticale Sammelrohre sowohl im Bereich des *Cortex renalis* als auch der cMKs eine starke CA-II Immunreaktivität einzelner, interkalierender Zellen, den schon erwähnten Schaltzellen mit wichtiger Funktion für den Säure-Basen Haushalt (Abb. 22 und 23A - F). Die Hauptzellen der Sammelrohre zeigten keine immunhistochemisch identifizierbare Expression der CA-II. Ausgeprägte Immunfluoreszenz-Signale für CA-II Expression konnten andererseits für den dicken aufsteigenden Schenkel der Henleschen Schleifen corticaler (Abb. 22 und 23A), in geringerem Maße auch medullärer Nephrone aufgezeigt werden. Im *Cortex renalis* lokalisierte proximale Tubuli (PT) wiesen eine schwächere homogene Immunmarkierung für CA-II auf, wohingegen sowohl die distalen Tubuli (DT) als auch das intermediäre Segment der RT-Nephrone eine hohe CA-II Expression demonstrierten (Abb. 21E, 22 und 23A).

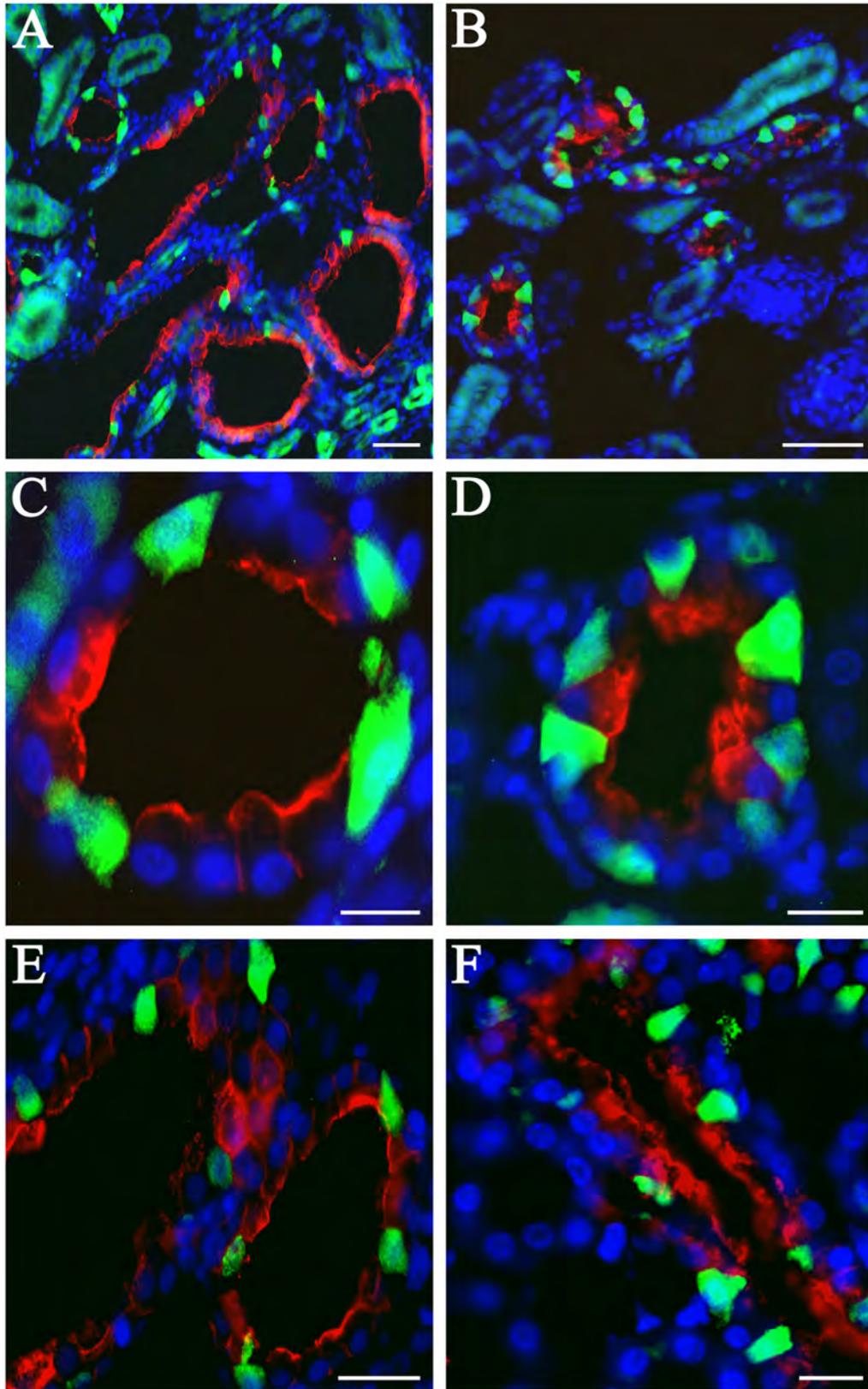
**Abb. 23 : Co-Distribution AQP-2 immunpositiver Hauptzellen und CA-II immunpositiver Schaltzellen in corticalen Sammelrohren der Hühnerniere.**

Längs und quer angeschnittene Sammelrohre corticaler Markkegel (A, C, E) bzw. eines *Cortex renalis* (B, D, F) mit AQP-2 Expression in Haupt- und CA-II Expression in interkalierenden Schaltzellen (A - F). In A sind darüber hinaus CA-II immunpositive proximale Tubuli (links oben) sowie dicke aufsteigende Schenkel der Henleschen Schleifen (rechts unten) zu erkennen.

C und D stellen Ausschnittsvergrößerungen aus A respektive B dar.

Nachweis der AQP-2 Expression durch Markierung mit affinitätsgereinigtem rabbit anti-rAQP-2 als Primärantikörper und Cy3-gekoppeltem goat anti-rabbit IgG als Sekundärantikörper. Nachweis der CA-II Expression durch Markierung mit mouse anti-chCA-II als Primär- und Alexa 488-gekoppeltem goat anti-mouse IgG als Sekundärantikörper. Markierung aller Zellkerne mit DAPI.

Die Eichbalken in B ist 100 µm, der in A 50 µm, der in E 25 µm und die in C, D, F 12,5 µm lang.

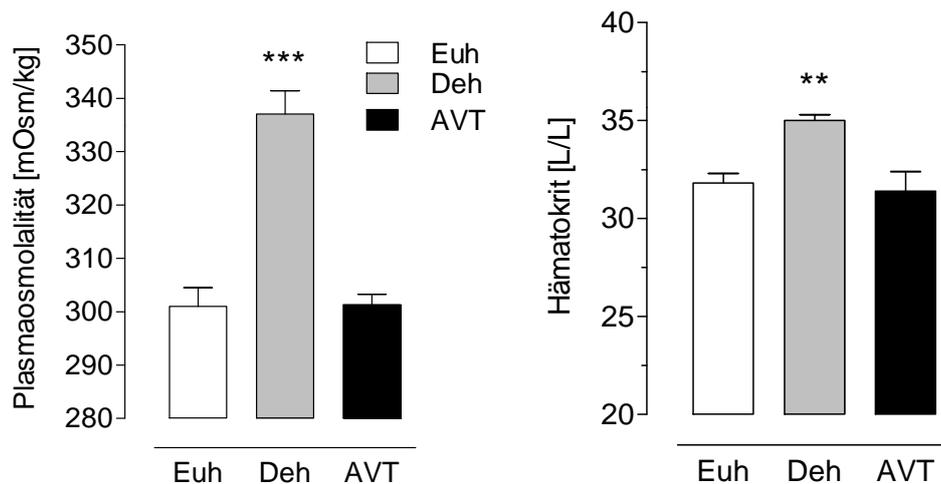


### **3.3. Die AVT-induzierte zelluläre Translokation des Wasserkanals AQP-2 in Sammelrohrzellen der Hühnerniere**

Als weiterführendes und wichtigstes Ziel der vorliegenden Arbeit galt es zu klären, ob eine gerichtete Translokation des Wasserkanals AQP-2 aus dem Zytoplasma der Hauptzellen der Sammelrohre in deren apikale bzw. laterale Zellmembran durch exogene AVT-Behandlung bzw. die endogen durch Trinkwasserentzug induzierte Erhöhung an zirkulierendem AVT - in Analogie zur Situation beim Säuger - nachgewiesen werden konnte. Um durch Modulation des Hormonsystems Veränderungen bezüglich der Translokation des AQP-2 nachzuweisen, wurden drei Tiergruppen gebildet: [1] eine euhydrierte, isotone Kontrollgruppe (Euh), [2] eine Gruppe mit endogener Stimulation des AVT-ergen Systems durch 40-stündigen Entzug des Trinkwassers (Deh) und [3] eine Gruppe mit exogener Applikation von AVT in einer Konzentration von 5 pmol/min/kg KG für 30 min (AVT).

#### ***3.3.1. Charakterisierung osmo- und volumenregulatorisch relevanter Blut- bzw. Plasma-parameter sowie der Plasmakonzentration an AVT***

Das extrazelluläre Flüssigkeitsvolumen (EZFV) sowie die extrazelluläre Tonizität (EZT), primär bedingt durch die Konzentrationen an Natrium und Chlorid als mengenmäßig bedeutensten Ionen, stellen die wesentlichen Regelgrößen für die hypothalamo-neurohypophysäre AVT-Synthese und -Freisetzung bei allen bis *dato* untersuchten Vogelspezies dar [Koike *et al.*, 1977, 1979; Gray und Simon, 1983; Gerstberger *et al.*, 1984b]. Dabei repräsentieren eine Hypovolämie der EZF bzw. dessen Hypertonizität die wichtigsten Parameter für die Stimulation der neurohypophysären AVT-Sekretion in die Blutbahn. Die durch 40-stündigen Trinkwasserentzug induzierte Dehydrierung der Hühner hatte eine hochsignifikante Zunahme sowohl der Plasmaosmolalität als auch des Hämatokritwertes in der aus der *V. basilyca* entnommenen Vollblut- bzw. Plasmaprobe zur Folge (Abb. 24). Im direkten Vergleich zu den Werten der euhydrierten Kontrollgruppe (Euh) mit einem mittleren Hkt-Wert von  $31,8 \pm 0,5$  L/L und mittleren Werten für die Plasmaosmolalität von  $301,0 \pm 3,5$  mOsm/kg wies die Deh-Gruppe Werte von  $35,0 \pm 0,3$  L/L respektive  $337,0 \pm 4,4$  mOsm/kg auf (Abb. 24). Die 30-minütige i.v. Infusion einer isotonen NaCl-Lösung mit 5 ng/min/kg KG AVT führte nicht zu einer Änderung der Hkt- bzw. Plasmaosmolalität im Vergleich zur Kontrollgruppe, mit Werten von  $31,4 \pm 1,0$  L/L bzw.  $301,4 \pm 1,9$  mOsm/kg (Abb. 24).



**Abb. 24 :** Plasmaosmolalität und Blut-Hämatokrit Werte in Abhängigkeit vom Hydrations-Status der Hühner bzw. nach exogener AVT-Infusion.

Werte der Plasmaosmolalität [mOsm/kg] und des Hämatokritwertes [L/L] in venösen Blutproben von Hühnern unter euhydrierten Kontrollbedingungen (**Euh**), nach 40-stündigem Trinkwasserentzug (**Deh**) sowie nach einer 30-minütigen i.v. Infusion von AVT (5 ng/min/kg KG) in isotoner Kochsalzlösung (0,5 ml/min) (**AVT**).

Alle Daten sind als Mittelwerte mit Standardfehler (S.E.M.) dargestellt. Für den statistischen Vergleich der drei Versuchsgruppen (n = 6 - 7) kam der nicht-parametrische Mann-Wilcoxon U-Test zur Anwendung. Unterschiede zwischen den Mittelwerten der jeweiligen Blut- bzw. Plasmadaten wurden als signifikant wie folgt markiert :  $2P \leq 0,01$ (\*\*),  $2P \leq 0,001$ (\*\*\*).

Die freundlicherweise von Prof. Dr. David A. Gray aus Johannesburg durchgeführte radioimmunologische Bestimmung der AVT-Konzentrationen in lyophilisierten Plasma-proben aller Versuchstiere erbrachte eine signifikante Zunahme der Plasmakonzentration an AVT von  $10,4 \pm 3,6$  pg/ml unter euhydrierten Kontrollbedingungen auf mittlere Werte von  $38,2 \pm 10,8$  pg/ml ( $2P \leq 0,01$ ) nach 40 Stunden extrazellulärer Dehydratation. Nach der 30-minütigen exogenen AVT-Infusion (5 ng/min/kg KG) - die keine Änderung der Plasmaosmolalität und des Hkt-Wertes zur Folge hatte - lagen die Plasmawerte für AVT bei  $78,5 \pm 15,2$  pg/ml ( $2P \leq 0,01$ ) und damit im oberen physiologischen Bereich. Werte dieser Größenordnung werden etwa bei ausgeprägter Hypovolämie durch Blutverlust bzw. während der Oviposition erreicht. Sowohl die endogene Aktivierung des AVT-Systems durch eine kombinierte hypovolämische und hypernaträmische Stimulation aufgrund des Trinkwasserentzuges als chronischem Stimulus, als auch die akute exogene Infusion synthetischen AVTs hatte also eine ausgeprägte, signifikante Erhöhung des Plasma AVT-Spiegels zur Folge.

### 3.3.2. Auswertung der Translokation des Aquaporins

Um nachzuweisen, inwieweit endogen längerfristig bzw. exogen akut erhöhte Plasmakonzentrationen an AVT zu einer zellulären Translokation des Wasserkanals AQP-2 in Epithelzellen von Sammelrohren der Hühnerniere führten, wurden für die drei genannten Versuchstiergruppen (Euh, Deh, AVT) (je n = 5) gemäß des in Kap. 2.2.2.4.6 des Methodenteils detailliert beschriebenen Ansatzes ausführliche Zellzählungen AQP-2 immunpositiver Epithelzellen sowie deren Einteilung in die Verteilungsmuster A - G vorgenommen, die hier noch einmal aufgeführt werden :

- [A] Diffuse AQP-2 Verteilung im gesamten Zytoplasma, schwache Markierung
- [B] Diffuse AQP-2 Verteilung im gesamten Zytoplasma, starke Markierung
- [C] Partikuläre, zytosolisch-submembranale AQP-2 Verteilung
- [D] Zytosolisch-subapikale AQP-2 Verteilung
- [E] Apikal (sub-)membranale AQP-2 Verteilung
- [F] Lateral (sub-)membranale AQP-2 Verteilung
- [G] Apikal und lateral (sub-)membranale AQP-2 Verteilung

Dabei wurde zwischen den drei relevanten histologischen Zonen der Hühnerniere, nämlich dem *Cortex renalis*, dem corticalen Markkegel (cMK) sowie dem medullären Markkegel (mMK) unterschieden.

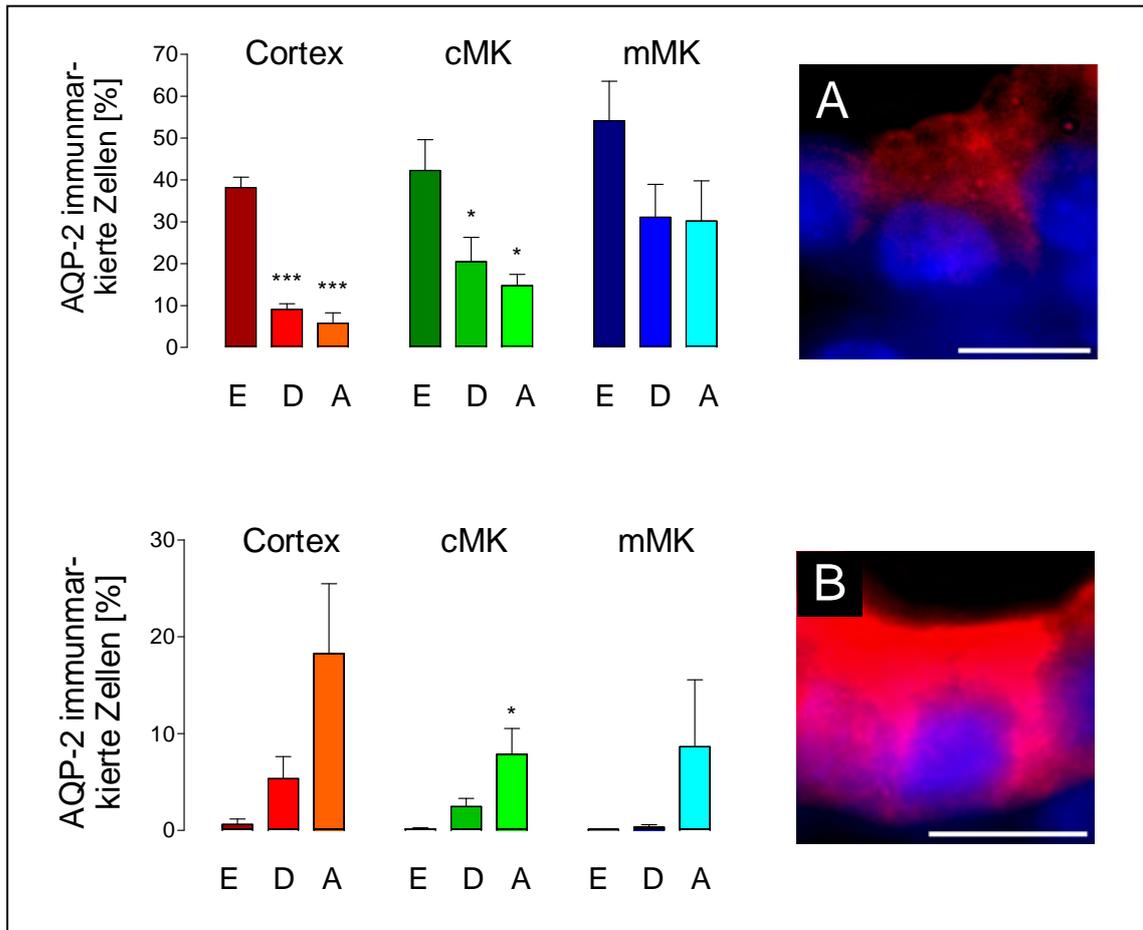
Die der Kategorie A zugeordneten Zellen zeigten typischerweise eine homogene AQP-2 Expression im Bereich des gesamten Zytosols der jeweiligen Epithelzelle (Hauptzelle) eines Sammelrohres auf niedrigem bis moderatem Niveau, ohne immunhistochemischer Markierung der apikalen sowie basolateralen Plasmamembranen (Abb. 25, oben). Die Fraktion der gemäß Kategorie A für AQP-2 immunpositiv markierten Zellen erwies sich unter Versuchsbedingungen der Euhydratation (Euh) für alle drei renalen Gewebsbereiche - neben der Fraktion der Kategorie C (siehe übernächster Paragraph) - als die größte, mit 38,2 %, 42,3 % und 54,1 % Anteil an der AQP-2 exprimierenden Gesamtzellpopulation (Kategorien A - G) des *Cortex renalis* (CR), des corticalen (cMK) und des medullären Markkegels (mMK) (Tab. 4; Abb. 25, oben). Der 40-stündige Entzug des Trinkwassers in der Gruppe der dehydrierten Tiere (Deh) bedingte eine signifikante Reduktion im prozentualen Anteil der gemäß Kategorie A AQP-2 immunpositiv markierten Hauptzellen der Sammelrohre, mit stärkster Ausprägung im Bereich des CR. So konnten nach Dehydratation nur noch 23,7 %, 48,4 % respektive 57,4 % der unter Kontrollbedingungen der Euhydratation in CR, cMK respektive mMK quantitativ erfassten Hauptzellen mit homo-

gener, zytoplasmatischer Verteilung der AQP-2 spezifischen Expression (Kategorie A) ermittelt werden (Tab. 4; Abb. 25, oben). Ein zur extrazellulären Dehydratation mit erhöhten Plasmaspiegeln an AVT vergleichbares Bild ergab sich nach exogener Applikation des antidiuretischen Hormons (5 ng/min/kg KG). Lediglich 15,1 %, 35,0 % respektive 55,7 % der AQP-2 immunpositiven Hauptzellen in CR, cMK respektive mMK zeigten noch das interzelluläre Verteilungsmuster gemäß Kategorie A (Tab. 4; Abb. 25, oben).

	<i>Cortex renalis</i> (CR)			Corticaler Markkegel (cMK)			Medullärer Markkegel (mMK)		
	Euh	Deh	AVT	Euh	Deh	AVT	Euh	Deh	AVT
A	38,16 ± 2,50	9,06 ± 1,35	5,78 ± 2,47	42,26 ± 7,32	20,46 ± 5,85	14,78 ± 2,62	54,14 ± 9,40	31,06 ± 7,85	30,14 ± 9,61
B	0,62 ± 0,57	5,36 ± 2,27	18,24 ± 7,22	0,15 ± 0,12	2,46 ± 0,83	7,86 ± 2,65	0,04 ± 0,04	0,34 ± 0,23	8,64 ± 6,91
C	38,92 ± 5,79	24,14 ± 4,91	14,84 ± 4,08	37,26 ± 9,55	39,18 ± 6,29	21,18 ± 9,85	31,88 ± 10,20	29,90 ± 6,12	40,32 ± 12,96
D	10,00 ± 5,09	18,76 ± 2,71	10,80 ± 5,72	4,36 ± 2,94	9,84 ± 1,80	9,30 ± 3,74	2,48 ± 2,28	6,22 ± 2,54	1,26 ± 0,79
E	5,66 ± 3,27	33,32 ± 8,08	5,88 ± 2,73	1,40 ± 1,01	10,16 ± 1,92	5,36 ± 2,17	0,26 ± 0,16	7,76 ± 1,45	4,00 ± 2,69
F	5,80 ± 2,31	0,02 ± 0,02	34,12 ± 4,71	14,36 ± 5,88	6,02 ± 4,48	33,96 ± 9,21	12,24 ± 7,01	6,18 ± 5,50	6,82 ± 2,92
G	0,76 ± 0,35	9,30 ± 4,16	10,20 ± 2,39	0,22 ± 0,22	12,02 ± 4,27	7,54 ± 2,40	0,02 ± 0,02	16,04 ± 6,15	8,84 ± 6,24

**Tab. 4. Daten-Übersicht bezüglich der Auswertung zur AVT-induzierten zellulären Translokation des AQP-2 in der Hühnerniere.**

Immunhistochemische Analyse der zellulären AQP-2 Translokation in Nieren euhydrierter (Euh), dehydrierter (Deh) und mit AVT (5 ng/min/kg KG) infundierter Hühner. Einteilung der intrazellulären AQP-2 Expressionsmuster in ausgewerteten Hauptzellen der Sammelrohre aus den Bereichen des *Cortex renalis* (CR), des corticalen Markkegels (cMK) und des medullären Markkegels (mMK) in Kategorien A - G. Darstellung der Daten (jeweils prozentualer Anteil an allen Zellen eines Nierenareals und einer Versuchstiergruppe; Summe A - G = 100 %) als Mittelwerte mit Standardfehlern (S.E.M.).



**Abb. 25 :** AVT-induzierte AQP-2 Translokation : Cytoplasmatische Signale der Zellkategorien A und B in *Cortex renalis*, corticalen und medullären Markkegeln der Hühnerniere.

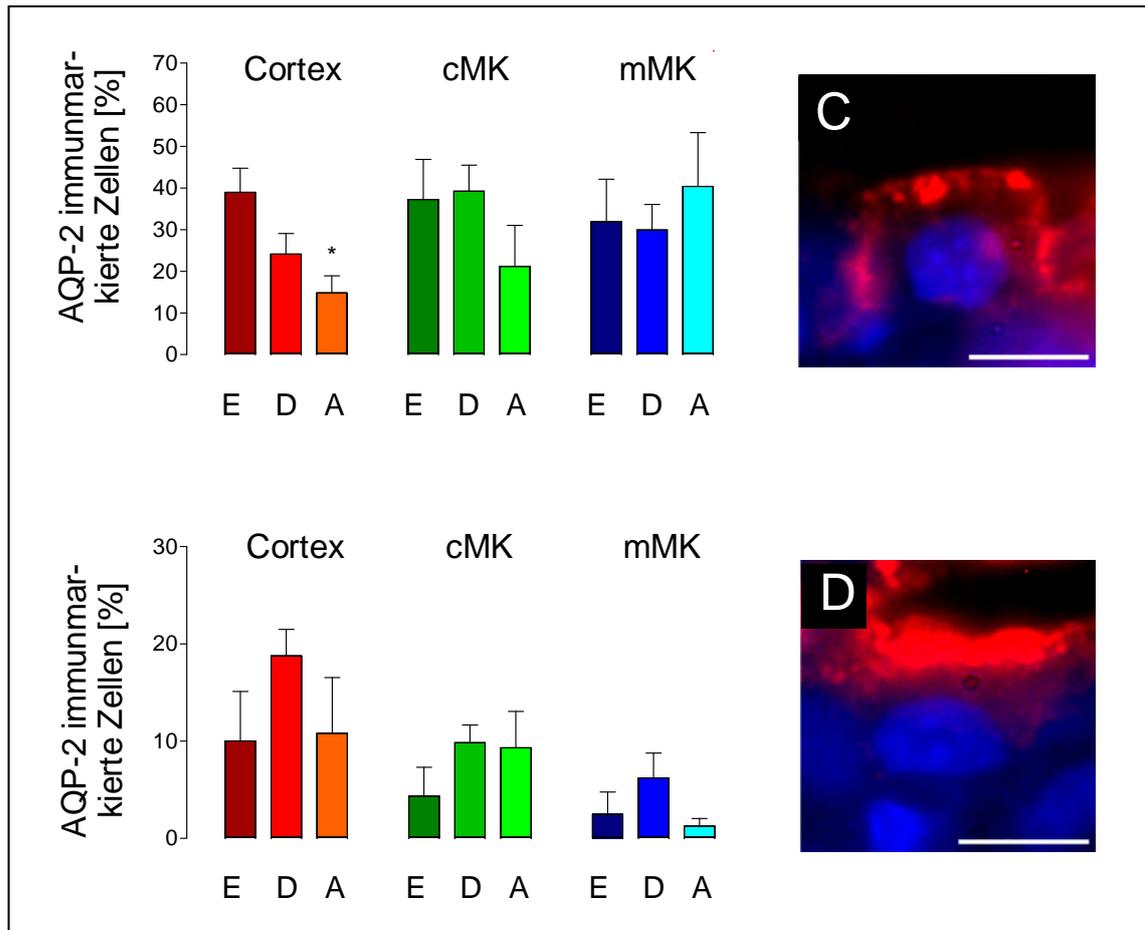
Darstellung der prozentualen Verteilung der Zellkategorie A (diffuse AQP-2 Verteilung im gesamten Zytoplasma, schwache Markierung) und Zellkategorie B (diffuse AQP-2 Verteilung im gesamten Zytoplasma, starke Markierung) an der Gesamtzellpopulation AQP-2 immunreaktiver Hauptzellen aus Sammelrohren des *Cortex renalis* (Cortex), des corticalen (cMK) und des medullären Markkegels (mMK). Direkter Vergleich zwischen AQP-2 immunreaktiven Hauptzellen euhydrierter Kontrolltiere (Euh = **E**; n = 5), von Tieren nach 40-stündigem Trinkwasserentzug (Deh = **D**; n = 5) sowie nach systemischer AVT-Applikation (5 ng/min/kg KG; 30 min) (AVT = **A**; n = 5).

Der Balken in der Zellabbildung beträgt 6,5  $\mu$ m. Alle Daten sind als Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt. Statistischer Vergleich zwischen Daten der Tiergruppen mit erhöhter Plasmakonzentration an AVT (Deh, AVT) und der euhydrierten Kontrollgruppe (Euh) mittels nicht-parametrischem Mann-Wilcoxon-U-Test. Signifikanzen von  $2P \leq 0,05$  (\*),  $2P \leq 0,001$  (\*\*\*)).

Als Charakteristikum der Zellkategorie B galt eine homogene AQP-2 Expression im Bereich des gesamten Zytoplasmas der jeweiligen Hauptzelle eines Sammelrohres auf hohem Niveau, ohne immunhistochemische Markierung der apikalen bzw. basolateralen Plasmamembranen (Abb. 25, unten). Bei unter euhydrierten Kontrollbedingungen (Euh) durchge-

fürten Versuchen ließ sich für alle drei renalen Substrukturen (CR, cMK und mMK) ein nur sehr geringer Prozentsatz ( $< 1\%$ ) AQP-2 immunfluoreszenzmarkierter Zellen der Zellkategorie B nachweisen (Tab. 4; Abb. 25, unten). Extrazelluläre Dehydrierung der Hühner durch Trinkwasserentzug führte zu einer tendentiellen, statistisch jedoch nicht signifikanten Erhöhung stark AQP-2 exprimierender Hauptzellen sowohl im *Cortex renalis* (5,4 % aller Zellen) als auch den cMKs (2,5 % aller Zellen), nicht jedoch den mMKs (Tab. 4; Abb. 25, unten). Die systemische Infusion von 5 ng/min/kg KG AVT schließlich induzierte eine markante Zunahme an zytosolischer AQP-2 Expression in allen drei Bereichen der Hühnerniere, mit besonders starker Ausprägung im CR bei einem Anteil des Markierungsmusters B von 18,2 % aller ausgewerteter Hauptzellen, bei allerdings starker interindividueller Streuung. Etwa 7,9 % respektive 8,4 % aller AQP-2 immunpositiver Hauptzellen der cMKs respektive mMKs konnten in Zellkategorie B eingeordnet werden, wobei sich die Zunahme gegenüber der Kontrollgruppe für die cMKs, nicht jedoch mMKs als statistisch signifikant errechnete (Tab. 4; Abb. 25, unten).

Die Zellkategorie C zeichnete sich durch den histologischen Nachweis submembranaler, vesikulärer AQP-2 immunreaktiver Strukturen aus, wobei die apikale, teilweise auch die laterale, nicht jedoch die basale Zellmembran als Assoziationsstruktur für die vesikulären Strukturen diente (Abb. 26, oben). Neben der Zellkategorie A repräsentierte die eben dargestellte submembranal-vesikuläre Anreicherung AQP-2 spezifischer Expression das unter euhydrierten Kontrollbedingungen (Euh) das am weitesten verbreitete Muster, bei einem Anteil von 38,9 %, 37,3 % respektive 31,9 % in den Bereichen von CR, cMK respektive mMK (Tab. 4; Abb. 26, oben). Der Entzug des Trinkwassers (Deh) hatte keinen signifikanten Einfluss auf den prozentualen Anteil der Zellkategorie C an der Gesamtzellpopulation AQP-2 immunreaktiver Hauptzellen der Hühnerniere; lediglich im Bereich des *Cortex renalis* konnte eine nicht signifikante Reduktion von 38,9 % auf 24,1 % demonstriert werden (Tab. 4; Abb. 26, oben). Die Erhöhung der AVT-Plasmakonzentration durch systemische Applikation des Hormones führte zu einer signifikanten Verringerung von der Kategorie C zugeordneten Hauptzellen des CR auf 38,1 % der unter euhydrierten Kontrollbedingungen quantitativ erfassten Epithelzellen mit AQP-2 Immunreaktivität. Die nahezu vergleichbare Reduktion im Bereich der cMKs zeigte sich als nicht signifikant (Tab. 4; Abb. 26, oben).



**Abb. 26 :** AVT-induzierte AQP-2 Translokation : Submembranale, vesikuläre Signale der Zellkategorie C und D in *Cortex renalis*, corticalen und medullären Markkegeln der Hühnerniere.

Darstellung der prozentualen Verteilung der Zellkategorie C (vesikuläre, zytosolisch-submembranale AQP-2 Verteilung) und Zellkategorie D (zytosolisch-subapikale AQP-2 Verteilung) an der Gesamtzellpopulation AQP-2 immunreaktiver Hauptzellen aus Sammelrohren des *Cortex renalis* (Cortex), des corticalen (cMK) und des medullären Markkegels (mMK). Direkter Vergleich zwischen AQP-2 immunreaktiven Hauptzellen euhydrierter Kontrolltiere (Euh = **E**; n = 5), von Tieren nach 40-stündigem Trinkwasserentzug (Deh = **D**; n = 5) sowie nach systemischer AVT-Applikation (5 ng/min/kg KG für 30 min) (AVT = **A**; n = 5).

Der Balken in der Zellabbildung beträgt 6,5  $\mu\text{m}$ . Alle Daten sind als Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt. Statistischer Vergleich zwischen Daten der Tiergruppen mit erhöhter Plasmakonzentration an AVT (Deh, AVT) und der euhydrierten Kontrollgruppe (Euh) mittels nicht-parametrischem Mann-Wilcoxon-U-Test. Signifikanz von  $2P \leq 0,05$  (\*).

Die der Zellkategorie D zugeordneten Hauptzellen renaler Sammelrohre wiesen typischerweise eine ausgeprägte, teils vesikuläre Lokalisation AQP-2 spezifischer Immunreaktivität im apikalen Bereich des Zytoplasmas und damit enger Assoziation zur apikalen Zellmembran

auf (Abb. 26, unten). Die Fraktion der in Kategorie D eingeordneten Zellen belief sich auf 10,0 %, 4,4 % respektive 2,5 % der Gesamtheit aller AQP-2 immunreaktiven Hauptzellen in den Bereichen von CR, cMK respektive mMK, unter euhydrierten Kontrollbedingungen (Tab. 4; Abb. 26, unten). Weder die durch extrazelluläre Dehydratation endogen, noch die durch systemische Infusion exogen induzierte Erhöhung der Plasmakonzentration an AVT bewirkte eine signifikante Veränderung an der jeweiligen Fraktionsgröße der Zellkategorie D in einer der drei Behandlungsgruppen (Euh, Deh, AVT). Dabei stellte der *Cortex renalis* für diese Zellkategorie bei allen drei Versuchstiergruppen mit einem jeweiligen Anteil an der AQP-2 exprimierenden Gesamtzellpopulation von 10,0 % (Euh), 18,8 % (Deh) und 10,8 % (AVT) eine bedeutende renale Strukturkomponente dar, während der cMK und vor allem der mMK mit jeweiligen Anteilen von 2,5 %, 6,2 % und 1,3 % nur in wenigen ihrer Epithelzellen das beschriebene Lokalisationsmuster für AQP-2 zeigten (Tab. 4; Abb. 26, unten).

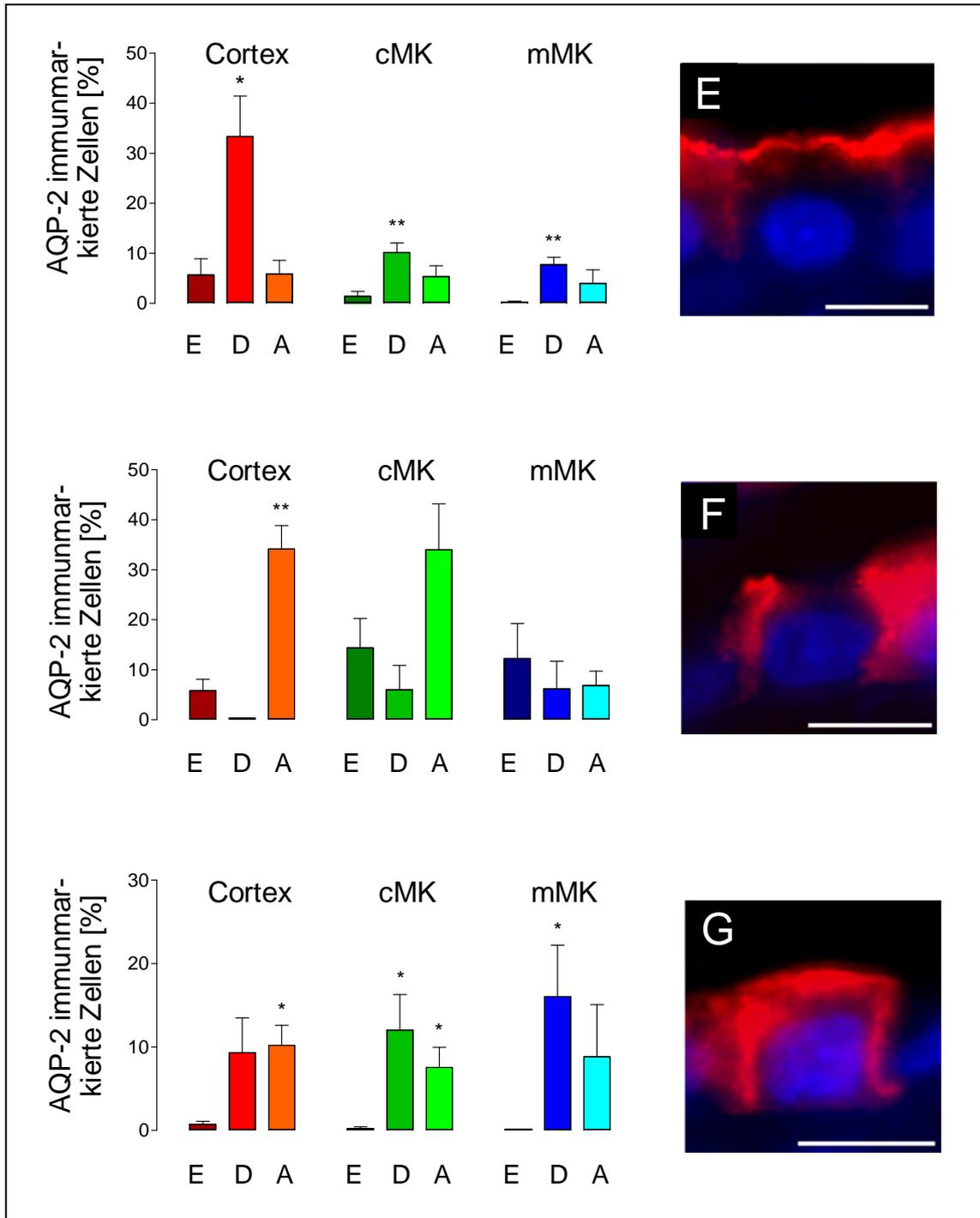
Die nachfolgend aufgeführten Zellkategorien E, F und G wiesen eine direkte Assoziation bzw. Inkorporation AQP-2 spezifischer Immunreaktivität mit der apikalen (E) bzw. lateralen Zellmembran (F) oder beiden Komponenten der zellulären Plasmamembran (G) auf. Typisch für Vertreter der Zellkategorie E war die deutliche AQP-2 Expression nahezu ausschließlich im Bereich der apikalen Zellmembran, ohne zusätzliche immunreaktive

**Abb. 27 : AVT-induzierte AQP-2 Translokation : Zellmembran-assoziierte Signale der Zellkategorien E – G in *Cortex renalis*, corticalen und medullären Markkegeln der Hühnerniere.**

Darstellung der prozentualen Verteilung der Zellkategorie E (apikal (sub-)membranale AQP-2 Verteilung), Zellkategorie F (lateral (sub-)membranale AQP-2 Verteilung) und Zellkategorie G (apikal und lateral (sub-)membranale AQP-2 Verteilung) an der Gesamtzellpopulation AQP-2 immunreaktiver Hauptzellen aus Sammelrohren des *Cortex renalis* (Cortex), des corticalen (cMK) und des medullären Markkegels (mMK). Direkter Vergleich zwischen AQP-2 immunreaktiven Hauptzellen euhydrierter Kontrolltiere (Euh = **E**; n = 5), von Tieren nach 40-stündigem Trinkwasserentzug (Deh = **D**; n = 5) sowie nach systemischer AVT-Applikation (5 ng/min/kg KG für 30 min) (AVT = **A**; n = 5).

Der Balken in der Zellabbildung beträgt 6,5 µm.

Alle Daten sind als Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt. Statistischer Vergleich zwischen Daten der Tiergruppen mit erhöhter Plasmakonzentration an AVT (Deh, AVT) und der euhydrierten Kontrollgruppe (Euh) mittels nicht-parametrischem Mann-Wilcoxon-U-Test. Signifikanzen von  $2P \leq 0,05$  (\*),  $.2P \leq 0,01$  (\*\*)



Markierung im Zytosol (Abb. 27, oben). In den Nieren der euhydrierten Kontrolltiere war die membranassoziierte Expression des Wasserkanals AQP-2 nur sehr geringfügig ausgeprägt. So ergab sich für die Fraktion der Kategorie E lediglich ein Anteil von 5,7 %, 1,4 % respektive 0,3 % an der AQP-2 exprimierenden Gesamtpopulation aller analysierten Hauptzellen von Sammelrohren des *Cortex renalis*, der cMKs respektive der mMKs

(Tab. 4; Abb. 27, oben). Die extrazelluläre Dehydrierung der Hühner durch 40-stündigen Entzug des Trinkwassers führte in Epithelzellen des CR sowie der cMKs und mMKS zu einer signifikanten, etwa 6-fachen Zunahme an immunreaktiven Zellen der Kategorie E. Diese stellte mit 33,3 % im Bereich des *Cortex renalis* sogar die am stärksten vertretene Fraktion. Für die corticalen und medullären Markkegel errechneten sich Fraktionsgrößen von 10,2 % und 7,8 %, entsprechend einer signifikanten Zunahme um das 6-fache bzw. 28-fache im Vergleich mit den Nieren der euhydrierten Kontrolltiere (Tab. 4; Abb. 27, oben). Die intravenöse Infusion von vogelspezifischem antidiuretischen Hormon (5 ng/min/kg KG) resultierte hingegen nicht in der Zunahme AQP-2 immunreaktiver Signale ausschließlich in der apikalen Zellmembran der Hauptzellen im CR (unverändert 5,9 %). Die 3-fache bzw. 14-fache Zunahme in cMKs bzw. mMKS - ausgehend von sehr niedrigen Werten bei Kontrolltieren - auf letztlich 5,4 % (cMK) bzw. 4,0 % (mMK) erwies sich als nicht signifikant (Tab. 4; Abb. 27, oben).

Charakteristisch für die Zellkategorie F war die markante AQP-2 Expression nahezu ausschließlich im Bereich der lateralen Zellmembran, ohne AQP-2 immunpositive Markierung in der apikalen Plasmamembran (Abb. 27, mitte). Für die Gruppe der euhydrierten Kontrolltiere errechnete sich ein Anteil von 5,8 %, 14,4 % respektive 12,2 % in Bezug auf die Gesamtpopulation AQP-2 immunreaktiver Epithelzellen der renalen Sammelrohre im *Cortex renalis*, den cMKs respektive den mMKS. Der Entzug des Trinkwassers mit dadurch ausgelöster extrazellulärer Hypovolämie und Hyperosmolalität (Abb. 24) sowie Erhöhung der AVT Plasmakonzentration auf das nahezu 4-fache der Vergleichswerte euhydrierter Hühner bedingte in dieser Zellkategorie offensichtlich keine AQP-2 immunpositive Markierung der lateralen Zellmembran in einer der drei histologisch relevanten Zonen der Hühnerniere (Tab. 4; Abb. 27, mitte). Für den medullären Markkegel mit mittleren Fraktionswerten von 6,8 % zeigte sich dies auch unter Versuchsbedingungen einer systemischen AVT-Applikation, also einer signifikant auf das 7,5-fache erhöhten AVT Plasmakonzentration bei unveränderter Plasmaosmolalität und Blutvolumen (Tab. 4; Abb. 27, mitte). Im Gegensatz dazu konnte im Bereich des CR der signifikant auf das 6-fache erhöhte Anteil von 34,1 % aller AQP-2 immunpositiven Epithelzellen der Kategorie F zugeordnet werden, was auf eine ausgeprägte Translokation des Wasserkanals in die laterale und nicht apikale Zellmembran hindeutete. In abgeschwächter, statistisch jedoch nicht sig-

nifikanter Form mit einer Steigerung auf das 2,5-fache bei Werten von 34,0 % konnte dies auch für die cMKs ermittelt werden (Tab. 4; Abb. 27, mitte).

Die der Zellkategorie G zugeordneten, Sammelrohr-spezifischen Epithelzellen der Hühneriere zeichneten sich durch eine ausgeprägte Translokation des Wasserkanals AQP-2 sowohl in apikale als auch laterale - nicht jedoch basale - Zellmembran aus (Abb. 27, unten). Dieses zelluläre Muster der AQP-2 Expression ließ sich für sammelrohrspezifische Hauptzellen aller drei Nierenbereiche (CR, cMK, mMK) unter euhydrierten Kontrollbedingungen in jeweils weniger als einem Prozent der Gesamtzellpopulation AQP-2 immunreaktiver Zellen nachweisen (Tab. 4; Abb. 27, unten). Extrazelluläre Dehydratation verbunden mit einer vermehrten neurohypophysären Freisetzung an AVT bewirkte eine signifikante Zunahme an AQP-2 immunpositiven Hauptzellen der Kategorie G in den Zonen der *Cortices renalis* (12-fach), der corticalen Markkegel (55-fach) sowie der medullären Markkegel (800-fach), so dass letztendlich 9,3%, 12,0 % respektive 16,0 % aller AQP-2 immunreaktiven Zellen der Kategorie G zugeordnet werden konnten (Tab. 4; Abb. 27, unten). Eine nahezu identische Beobachtung konnte in den Nieren der AVT-infundierten Hühner demonstriert werden. Hier ergaben sich prozentuale Anteile der Zellkategorie G an der Gesamtheit aller AQP-2 immunpositiven Zellen von 10,2 %, 7,5 % respektive 8,8 % für die Bereiche der CRs, der cMKs respektive der mMKs (Tab. 4; Abb. 27, unten).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nach extrazellulärer Dehydratation bzw. systemischer AVT-Applikation unterschiedliche Translokationsmuster quantitativ erfasst wurden, wengleich beide Stimuli u.a. mit einer signifikanten Erhöhung der Plasmakonzentration an AVT einhergingen (chronisch *versus* akut). Die Zellkategorien A und B mit ihrer charakteristisch homogenen AQP-2 Expression im Bereich des gesamten supranukleären Zytosolraumes spiegelten die Situation des in Speichervesikeln vorliegenden, „ruhenden“ AQP-2 Wasserkanals wieder und stellten somit die unstimulierte Ausgangssituation des AQP-2 Translokationsprozesses dar. Die Zellkategorien C und D zeichneten sich durch eine Konzentrierung vesikulärer sowie nicht-vesikulärer Agglomeration AQP-2 immunpositiver Signale im apikalen Drittel der Hauptzellen aus. Die Zellkategorien E - G repräsentierten das Endstadium der AQP-2 Translokation vorrangig in die apikale (Kategorie E)

oder laterale (Kategorie F) Plasmamembran, bzw. in apikale und laterale Plasmamembranen (Kategorie G) der Hauptzellen.

- Unter euhydrierten Kontrollbedingungen zeigten 40 - 55 % aller Epithelzellen in den drei Bereichen der Niere (CR, cMK, mMK) eine moderate, homogene AQP-2 Verteilung (Kat. A) und weitere 30 - 40 % aller Hauptzellen vesikulär im apikalen Drittel der Hauptzellen lokalisiertes, immunpositives AQP-2 (Kat. C). Der apikal und/oder lateral translozierte Anteil an Hauptzellen belief sich auf lediglich 12 - 15 % aller AQP-2 immunreaktiven Zellen (Kat. E - G).
- Der Entzug des Trinkwassers (extrazelluläre Dehydratation) resultierte in einer signifikanten Reduktion homogener, moderater AQP-2 Expression vor allem im *Cortex renalis* und cMK, weniger so im Bereich des mMK, auf 10 - 30 % der Hauptzellen (Kat. A). Der immunhistochemische Nachweis starker AQP-2 Expression im gesamten Zytosol konnte für 5 % aller AQP-2 positiver Hauptzellen im CR erbracht werden (Kat. B), bei nahezu unverändertem Anteil an Hauptzellen mit vorwiegend apikal-zytosolisch-vesikulärer AQP-2 Lokalisation von 35 - 45 % aller AQP-2 immunreaktiven Hauptzellen (Kat. C, D), je nach untersuchter Nierenregion. Aufgrund der Dehydratation erfolgte eine ausgeprägte Translokation von AQP-2 in die apikale Zellmembran alleine bzw. die apikale und laterale Zellmembran (Kat. E, G) (40 %, 20 % respektive 25 % aller AQP-2 immunpositiven Zellen im CR, cMK respektive mMK).
- Die systemische AVT-Applikation resultierte in einer signifikanten Reduktion homogener, moderater AQP-2 Expression vor allem im *Cortex renalis* und cMK, weniger so im Bereich des mMK, auf 5 - 30 % der Hauptzellen (Kat. A). Der immunhistochemische Nachweis starker AQP-2 Expression im gesamten Zytosol konnte für 20 % aller AQP-2 positiver Hauptzellen im CR, sowie ca. 8 % im cMK bzw. mMK erbracht werden (Kat. B), bei nahezu unverändertem Anteil an Hauptzellen mit vorwiegend apikal-zytosolisch-vesikulärer AQP-2 Lokalisation von 25 - 40 % aller AQP-2 immunreaktiven Hauptzellen (Kat. C, D), je nach untersuchter Nierenregion. Aufgrund der AVT-Infusion erfolgte eine ausgeprägte Translokation von AQP-2 in die laterale Zellmembran alleine bzw. die apikale und laterale Zellmembran (Kat. E, G) (45 %, 40 % respektive 12 % aller AQP-2 immunpositiven Zellen im CR, cMK respektive mMK).

### 3.4. AVT-induzierte Bildung von cAMP in der Hühnerniere

Die hormonale Induktion der renalen Antidiurese wird bei allen bis *dato* dahingehend untersuchten Säugetieren in erster Linie durch die Bindung des neurohypophysären Peptidhormones AVP an das V<sub>2</sub>-Rezeptorprotein in der basolateralen Zellmembran der Hauptzellen im Bereich der Sammelrohre bewirkt. Dabei kommt es G-Protein vermittelt zu einer Aktivierung der membranständigen Adenylatzyklase mit nachfolgender Generierung des *second messenger* cAMP [Birnbauer, 2000; Lorenz *et al.*, 2003; Hoffert *et al.*, 2005; Fenton *et al.*, 2007]. Die cAMP-induzierte Aktivierung der Proteinkinase A führt zur Phosphorylierung des Kanalproteins AQP-2 und initiiert auf diesem Weg die Translokation des Wasserkanals vom Zytosol in die Plasmamembran [Nielsen *et al.*, 1995a; Gouraud *et al.*, 2002].

Um in Analogie zur Situation bei den Säugetieren intrazelluläre cAMP-Signale als möglichen *second messenger* Pfad auch für die AVT-induzierte AQP-2 Translokation in der Hühnerniere nachweisen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit ein cAMP-spezifisches, polyclonales Antiserum in der indirekten Immunhistochemie an der Hühnerniere eingesetzt. Neben dem generellen Nachweis AVT-induzierter cAMP-Bildung in glomerulo-tubulären Substrukturen der Nephrone galt daher das besondere Augenmerk einer möglichen Co-Lokalisation von cAMP und AQP-2 nach exogener bzw. endogener Stimulation des AVTergen Systems. Aufgrund der Tatsache, dass beide experimentell zur Verfügung gestanden habenden kommerziellen Antiseren in Kaninchen generiert wurden, kamen für den immunhistochemischen Nachweis serielle Gefrierschnitte des Nierengewebes mit minimaler Schnittdicke (4 - 6 µm) zum Einsatz. Diese wurden in alternierender Reihenfolge auf zwei Serien von Objektträgern aufgebracht, welche für den Immunfluoreszenz-Nachweis entweder der AQP-2 oder der cAMP Expression bearbeitet wurden. Alle digitalen Kameraaufnahmen der jeweiligen Immunfluoreszenzen wurden unter identischen Bedingungen vorgenommen, um z.B. einen direkten Vergleich der Intensitäten an cAMP Expression in verschiedenen nephronalen Struktureinheiten durchführen zu können. Wie schon im Methodenteil beschrieben (Kap. 2.2.2.1), wurden zwei euhydrierte Kontrolltiere, drei Tiere nach 40-stündigem Trinkwasserentzug sowie drei Hühner nach exogener Verabreichung von AVT (50 ng/min/kg) für den immunhistochemischen cAMP / AQP-2 Nachweis herangezogen.

Basale cAMP immunpositive Signale sowie intrazelluläre cAMP Immunreaktivität nach endogener Aktivierung des AVTergen Systems (Dehydratation) bzw. exogener Infusion von AVT *in vivo* konnten in allen Bereichen der Hühnerniere sowohl für MT- als RT-Glomerula aufgezeigt werden (Abb. 28A). Im direkten Vergleich mit den sequentiell HE-gegengefärbten Gewebsschnitten kann von einer vorrangigen Markierung einzelner Mesangialzellen beider Glomerulotypen ausgegangen werden. Die eindeutig stärkste Markierung für intrazellulär gebildetes cAMP ergab sich für einzelne Zellen distaler Tubuli, welche zudem eine leichte Autofluoreszenz aufwiesen, die sich jedoch von der cAMP-spezifischen Immunfluoreszenz eindeutig abgrenzen ließ (Abb. 28C, D). Proximale Tubuli (Abb. 28B, C), corticale (Abb. 28F) und medulläre Sammelrohre (Abb. 28E) zeigten eine homogene, ausgeprägte Autofluoreszenz. Neben aromatischen Aminosäuren und Lipopigmenten sind vor allem Pyridin- und Flavin-Coenzyme wie NADH, NADPH oder FADH<sub>2</sub> für das störende Phänomen der Autofluoreszenz in tierischen Zellen verantwortlich [Monici, 2005]. Trotz dieser moderaten Autofluoreszenz ließen sich cAMP-spezifisch

**Abb. 28 : Immunhistochemischer Nachweis von cAMP in glomerulo-tubulären Strukturen der Hühnerniere.**

Immunhistochemische Markierung für intrazelluläres cAMP in Nierengewebe eines für 40 Stunden dehydrierten Huhnes. Systemische Applikation von IBMX ( $10^{-3}$  M/L) für 30 min vor Beginn der transkardialen Perfusionsfixierung zur Hemmung intrazellulärer Phosphodiesterasen. Dicke der fixierten Kryostatschnitte : 4 - 6  $\mu$ m.

[A]: Bereich eines MT-Glomerulum des unteren *Cortex renalis*.

[B]: Längs getroffener proximaler Tubulus (Pfeil) mit Autofluoreszenz und punktueller, cAMP-spezifischer Immunfluoreszenz.

[C]: Quergeschnittene proximale Tubuli mit Autofluoreszenz (eingezogener Pfeilkopf) sowie distale Tubuli mit markanter, cAMP-spezifischer Immunfluoreszenz in einzelnen Zellen (Pfeil).

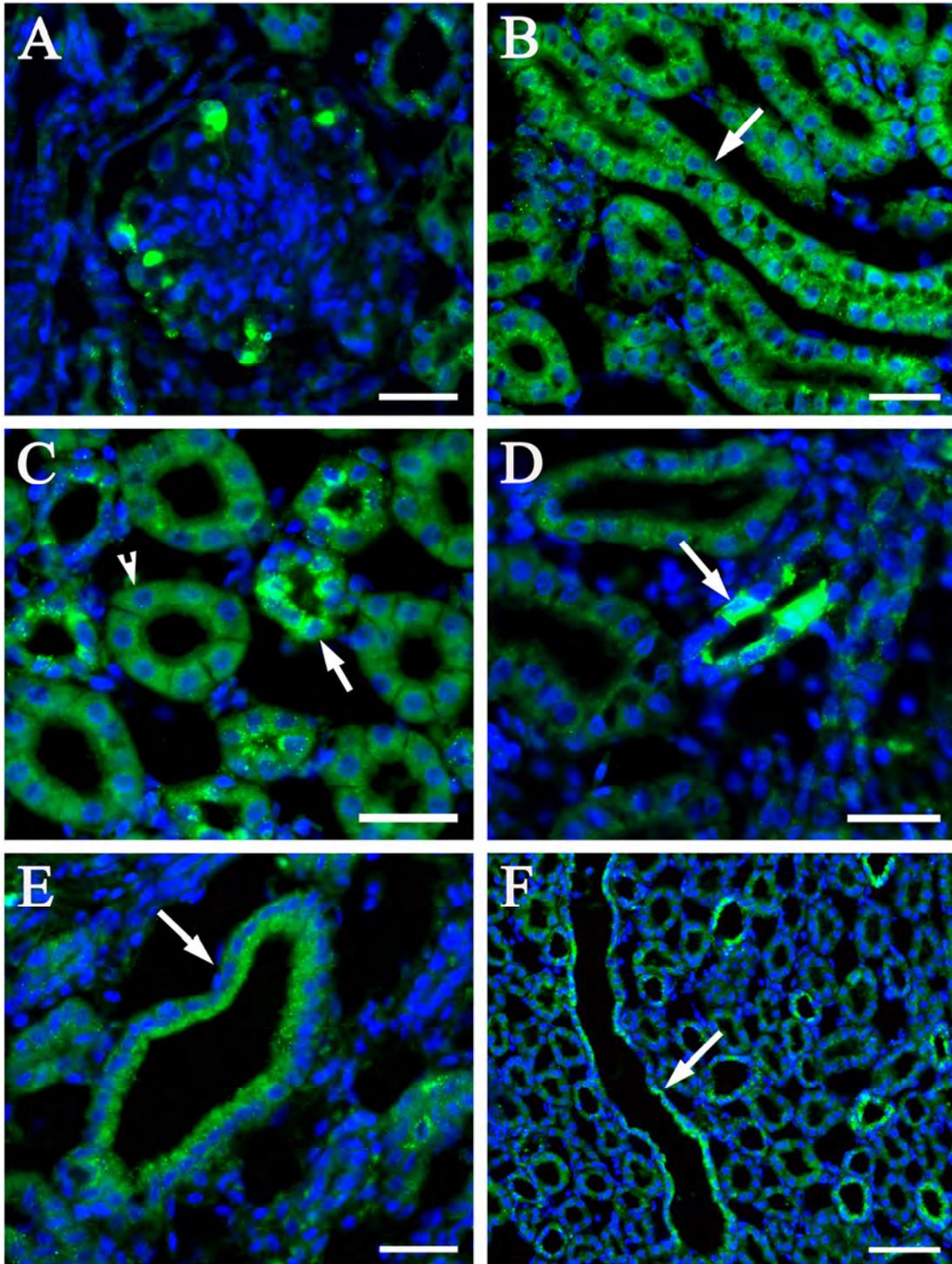
[D]: Quergeschnittener distaler Tubulus (DT) mit markanter, cAMP-spezifischer Immunfluoreszenz (Pfeil).

[E]: Medulläres Sammelrohr (Pfeil) mit hoher Autofluoreszenz.

[F]: Längs- (Pfeil) bzw. quergeschnittene corticale Sammelrohre aus dem Bereich des *Cortex renalis* mit schwacher Autofluoreszenz und cAMP-spezifischer Immunfluoreszenz.

Nachweis der cAMP Expression durch Markierung mit rabbit anti-cAMP als Primärantikörper und Alexa 488-gekoppeltem goat anti-rabbit IgG als Sekundärantikörper.

Die Eichbalken in A - E sind 25  $\mu$ m, derjenige in F 50  $\mu$ m lang.



immunfluoreszenzmarkierte Zellen vor allem im Bereich der Sammelrohre identifizieren, wie durch das „Weglassen“ des cAMP Antiserums im Procedere der Immunhistochemie an Parallelschnitten eindeutig nachweisbar. Sowohl für die Bereiche der Glomerula als auch aller tubulären Segmente konnten jedoch keine eindeutigen, qualitativen Unterschiede

zwischen den drei Tiergruppen hinsichtlich cAMP-positiver Zellzahlen und Fluoreszenz-Intensität verzeichnet werden. Da sich zelluläre Fluoreszenz-Signale hinsichtlich ihrer Intensität nur unzureichend quantifizieren lassen, wurde zudem von einer exakten semi-quantitativen Erfassung möglicher minimaler Unterschiede abgesehen.

Zum Nachweis der Co-Lokalisation von cAMP und AQP-2 in tubulären Segmenten der Hühnerniere wurden jeweils drei sequentielle Gewebsschnitte der Niere (à 4 - 6 µm) angefertigt. Dabei wurde der erste mit dem primären anti-AQP-2 Antikörper inkubiert, der zweite mit dem gegen cAMP gerichteten Antikörper; der dritte Nierenschnitt diente dem vergleichenden Nachweis der jeweiligen Autofluoreszenz. Während die Hauptzellen der Sammelrohre sowohl im *Cortex renalis* als auch in den Bereichen des corticalen und medullären Markkegels (letztere nicht gezeigt) eine markante Expression des Wasserkanals AQP-2 zeigten, konnten marginale cAMP immunpositive Signale in diesen lediglich in wenigen Epithelzellen nachgewiesen werden, bei oft schwieriger Abgrenzung von der moderaten Autofluoreszenz des Epithels (Abb. 29). Wie schon in Abb. 28 dargestellt, ergaben sich eindeutig immunreaktive Signale für intrazelluläres cAMP in Epithelzellen zahlreicher distaler Tubuli sowie dem Bereich der Glomerula (Abb. 29C, E).

**Abb. 29 : Vergleichender immunhistochemischer Nachweis für cAMP und AQP-2 in der Niere eines AVT-stimulierten Huhnes.**

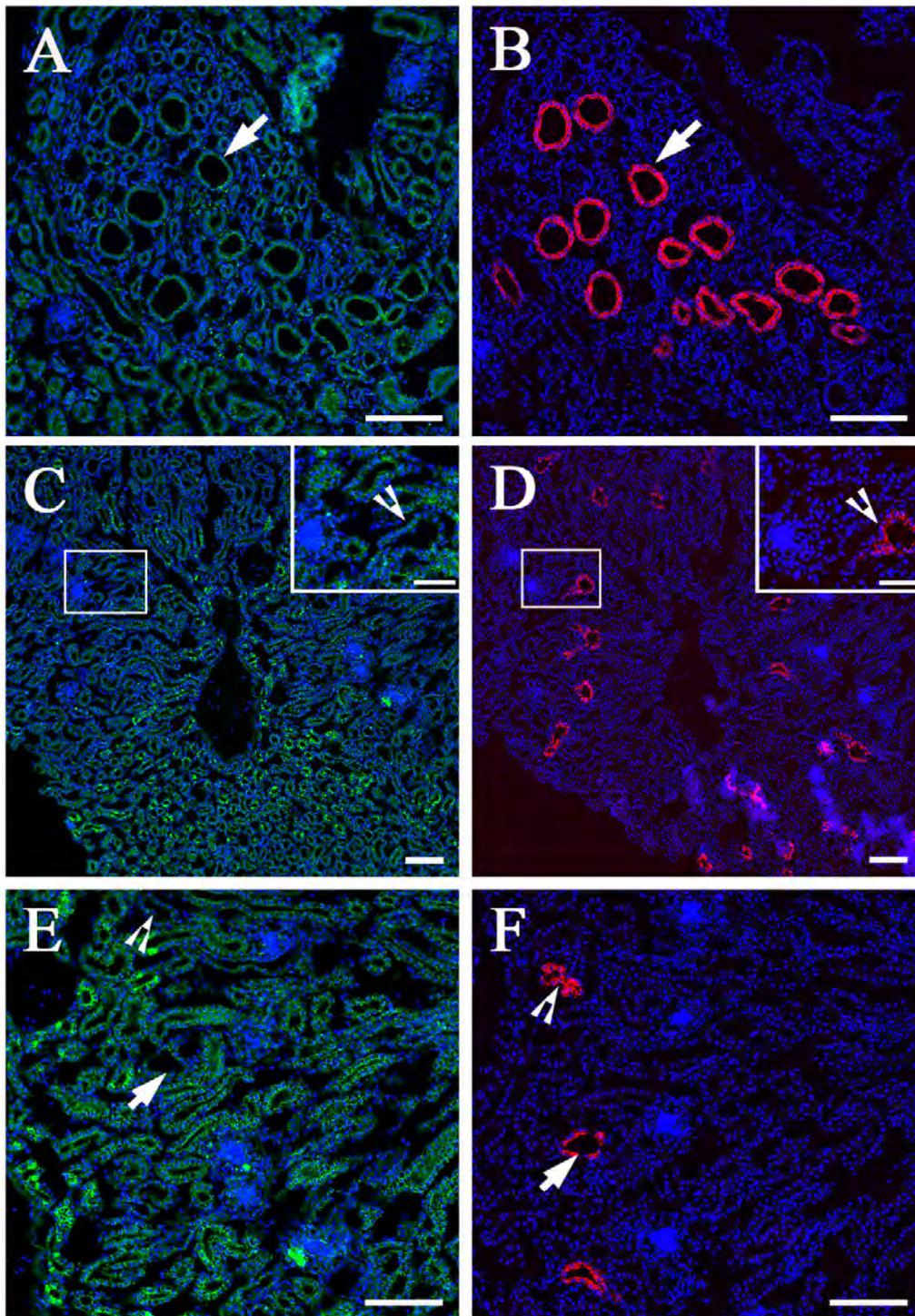
[A, B]: Sequentielle Gewebsschnitte (4 - 6 µm) im Bereich eines corticalen Markkegels. Die Sammelrohre des cMKs (Pfeile) zeigen eine moderate Autofluoreszenz (A) mit vereinzelt cAMP immunpositiven Epithelzellen; alle Sammelrohre exprimieren den Wasserkanal AQP-2 (B).

[C, D]: Sequentielle Gewebsschnitte (4 - 6 µm) im Bereich der *V. intralobularis* eines Nierenläppchens mit markanter Immunmarkierung für cAMP im Bereich einzelner RT-Glomerula sowie zahlreicher distaler Tubuli. Einzelne corticale Sammelrohre (Inset; eingezogener Pfeilkopf) weisen eine schwache Immunmarkierung für cAMP auf (C). Die meisten der AQP-2 immunpositiven corticalen Sammelrohre (D, inklusive Inset) zeigen keine oder lediglich marginale intrazelluläre cAMP-Bildung.

[E, F]: Vergrößerungen von C und D. Die markierten corticalen Sammelrohre (Pfeil, eingezogener Pfeil) weisen eine markante AQP-2 nicht jedoch cAMP Markierung auf. Deutlich erkennbar ist die markante cAMP Immunmarkierung von Epithelzellen der distalen Tubuli.

Nachweis der AQP-2 Expression durch Markierung mit affinitätsgereinigtem rabbit anti-rAQP-2 als Primärantikörper und Cy3-gekoppeltem goat anti-rabbit IgG als Sekundärantikörper. Nachweis der intrazellulären cAMP-Bildung durch Markierung mit einem rabbit anti-cAMP als Primär- und Alexa 488-gekoppeltem goat anti-mouse IgG als Sekundärantikörper. Markierung aller Zellkerne mit DAPI.

Die Eichbalken in A - D sind 100 µm, diejenigen der Insets in C, D sowie in E, F sind 50 µm lang.



Trotz intensiver mikroskopischer Analyse ließen sich keine eindeutigen Unterschiede in Verteilung und optischer Dichte der cAMP-Signale zwischen den drei untersuchten Tiergruppen verifizieren; darüber hinaus konnte eine Co-Lokalisation von cAMP und AQP-2 in Zellen der Sammelrohre nicht überzeugend nachgewiesen werden.

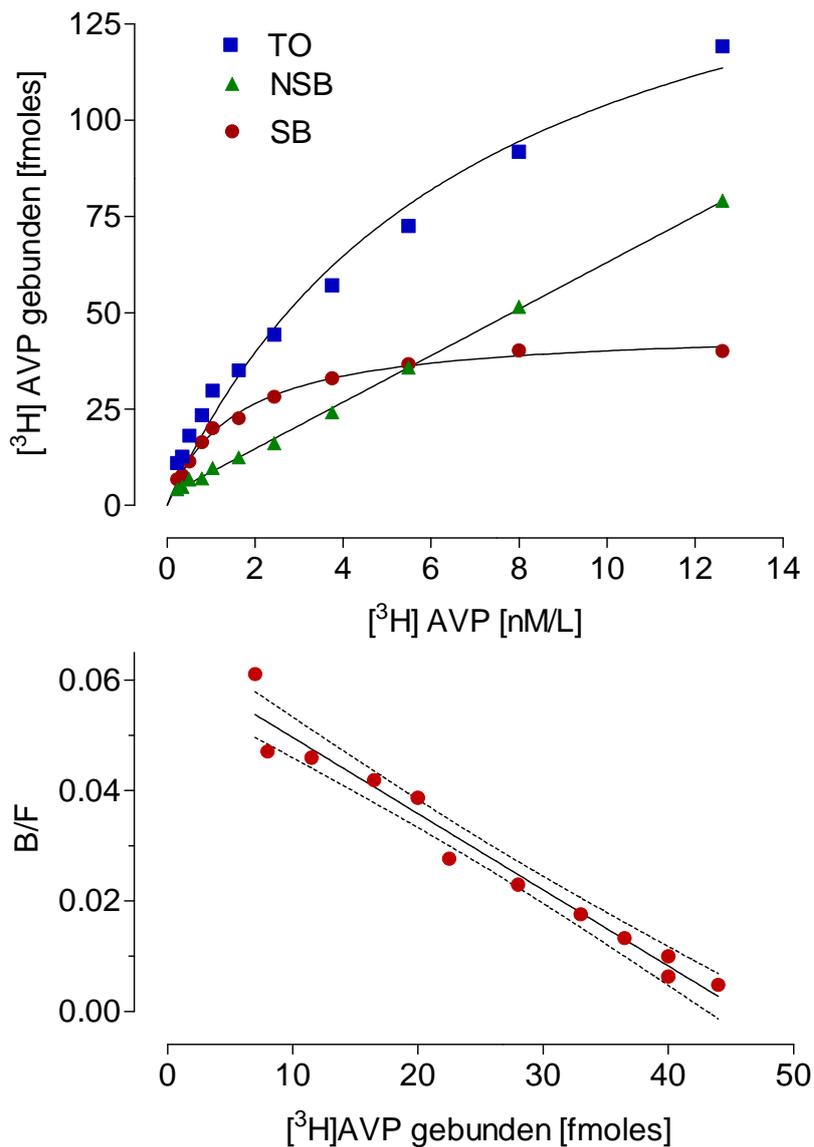
### 3.5. Charakterisierung des renalen AVT-rezeptiven Systems in der Hühnerniere

Das antidiuretische Hormon [Arg<sup>8</sup>]Vasotocin aus den magnozellulären Neuronen des PVN und SON bewirkte bei allen bis *dato* untersuchten Vogelspezies eine signifikante renale Antidiurese, vermittelt durch Bindung an membranständige, G-Protein gekoppelte Rezeptorproteine [Gerstberger *et al.*, 1997; Goldstein, 2006]. So führte auch bei Junghähnen unter Bedingungen einer experimentell induzierten Dauerdiurese die systemische Infusion von AVT (0,5 ng/min/kg KG) zu einer signifikanten, transienten Reduktion der renalen Wasserausscheidung [Mütze *et al.*, 2008]. Um eine mögliche Regulation der AVT-Rezeptor Interaktion durch endogen bzw. exogen erhöhte Plasmakonzentrationen an AVT beim Huhn nachweisen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst klassische Scatchard-Analysen mit Bindung des Radioliganden [<sup>3</sup>H]AVP gemäß Sättigungskinetik an eine angereicherte Plasmamembranfraktion der Hühnerniere *in vitro* durchgeführt.

#### 3.5.1. AVT induzierte „Down“-Regulation des renalen AVT-spezifischen Rezeptors

Zur Bestimmung der Anzahl (Konzentration) AVT-spezifischer Rezeptorproteine sowie deren Affinität für den Radioliganden [<sup>3</sup>H]AVP im Nierengewebe von Hühnern unter euhydrierten Kontrollbedingungen (Euh) sowie nach 40-stündiger Dehydratation (Deh) bzw. systemischer Applikation von AVT [5 ng/min/kg KG für 30 min] (AVT) wurde eine partielle Aufreinigung zellulärer Plasmamembranen aus den *Lobi craniales* bis *caudales* nach mechanischer Gewebekomposition und nachfolgender, differentieller Zentrifugation durchgeführt (Kap. 2.2.2.5.3). Als Radioligand kam [<sup>3</sup>H]AVP mittlerer spezifischer Aktivität (44 Ci/mmol) zur Anwendung, da tritiiertes AVT kommerziell nicht verfügbar war und sowohl [<sup>125</sup>I]AVP als auch [<sup>125</sup>I]AVT aus sterischen Gründen nicht an die entsprechenden Rezeptormoleküle zu binden vermögen [Gerstberger und Fahrenholz, 1989; Gerstberger *et al.*, 1997]. Die Ermittlung der Menge an Rezeptorprotein pro mg Gesamtprotein in der jeweiligen, renalen Plasmamembranfraktion (= B<sub>max</sub>) sowie der allgemeinen Dissoziationskonstanten K<sub>D</sub> [M/L] des Rezeptor-Radioliganden Komplexes erfolgte durch Sättigungsexperimente. Dabei wurde die jeweils durch das Experiment bestimmte Konzentration des Rezeptor-Ligand Komplexes ([<sup>3</sup>H]AVP gebunden) gegen die entsprechende Konzentration an freiem Radioliganden ([<sup>3</sup>H]AVP ungebunden) aufgetragen, wie in Kap. 2.2.2.5.1 erläutert.

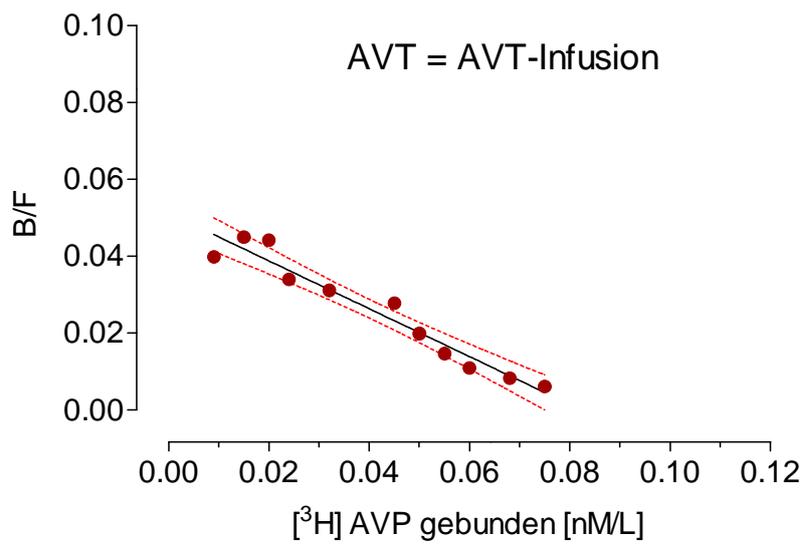
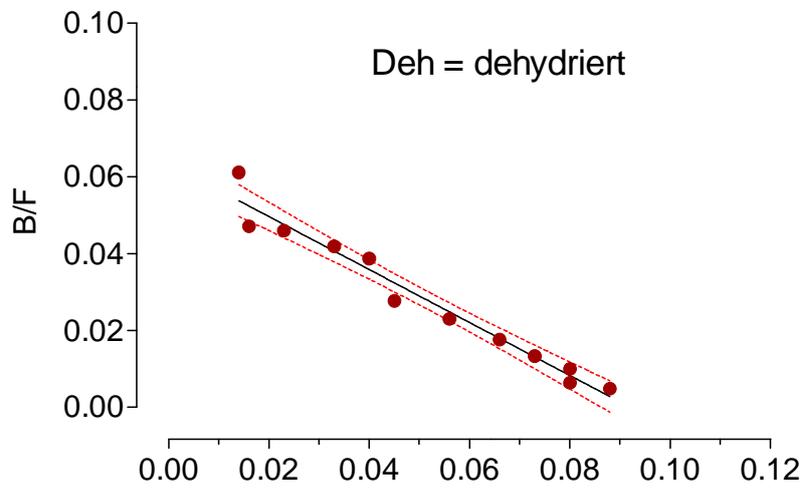
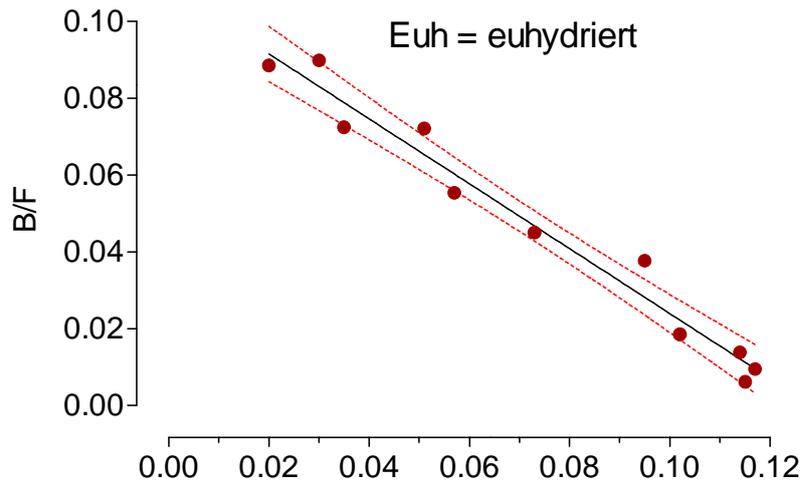
Wie für einen exemplarischen Einzelversuch mit der Membranpräparation aus Nierengewebe eines euhydrierten Kontrolltieres in Abb. 30 dargestellt, wurde [<sup>3</sup>H]AVP in Konzentrationen von 100 pM/L bis 20 nM/L eingesetzt. Dabei ergab sich für den niedrigen Konzentrationsbereich ein Verhältnis von spezifischer (= SB) zu unspezifischer Bindung (= NSB) von 3 : 1 bis 5 : 1, während dieser Quotient im oberen Konzentrationsbereich auf Werte von unter 1,0 abfiel. Die für die Werte der jeweils spezifischen Bindungsdaten errechnete Kurve (GraphPad Prism® 3) näherte sich asymptotisch einer Parallelen zur x-Achse an und zeigte somit eine charakteristische Sättigungskinetik. Die computergestützte Berechnung der B<sub>max</sub>- sowie K<sub>D</sub>-Werte erfolgte jedoch nicht aufgrund der gezeigten Sättigungskinetik, sondern nach entsprechender Konversion und Linearisierung der Bindungsdaten. Diese basierte hierbei auf den Verfahren nach Scatchard (1949) für die Interaktion von Proteinen mit kleinen Molekülen. Die folgerichtig als Scatchard-Plot bezeichnete graphische Darstellung ergab sich aus der Auftragung des Quotienten aus gebundenem zu freiem Radioliganden (B/F) gegen die Menge an gebundenem Radioliganden ([<sup>3</sup>H]AVP). Bei Vorhandensein lediglich eines Rezeptortyps entsteht eine Gerade, deren Steigung dem negativ reziproken Wert der Gleichgewichtskonstanten der Dissoziation (-1/K<sub>D</sub>) entspricht. Über den Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Abszisse wird die maximale Anzahl an Bindungsstellen (B<sub>max</sub>) in fmoles ermittelt. Bei Bezugnahme auf die Proteinkonzentration konnte die Rezeptordichte pro in den Versuch eingesetzter Proteinkonzentration (in der Plasmamembranfraktion) bestimmt werden (als Rezeptorprotein in fmoles pro mg Protein). Abb. 31 zeigt exemplarisch einen direkten Vergleich linearisierter Scatchard-Plots für die Rezeptor-Liganden Interaktion in der angereicherten Plasmamembranfraktion von Nierengewebe eines euhydrierten Kontrolltieres (Euh), eines Tieres nach 40-stündigem Wasserentzug (Deh) sowie eines Huhnes nach systemischer Applikation von AVT (AVT). Dabei ergaben sich in allen Fällen (n = 6 - 7 pro Gruppe) eindeutig lineare Beziehungen mit Korrelationskoeffizienten (= r<sup>2</sup>) von 0,91 bis 0,99 und p-Werten < 0,0001. Dementsprechend konnten enge 95 % Vertrauensintervalle errechnet werden (Abb. 31). Man kann somit bei allen drei Versuchsgruppen von einer homogenen Rezeptorpopulation für den Radioliganden ausgehen, mit nicht interagierenden Bindungsstellen. Die dargestellten Einzelversuche deuten eine durch endogen erhöhte bzw. exogen appliziertes AVT hervorgerufene Reduktion von B<sub>max</sub> bei nahezu unverändertem K<sub>D</sub>-Wert an (Abb. 31).

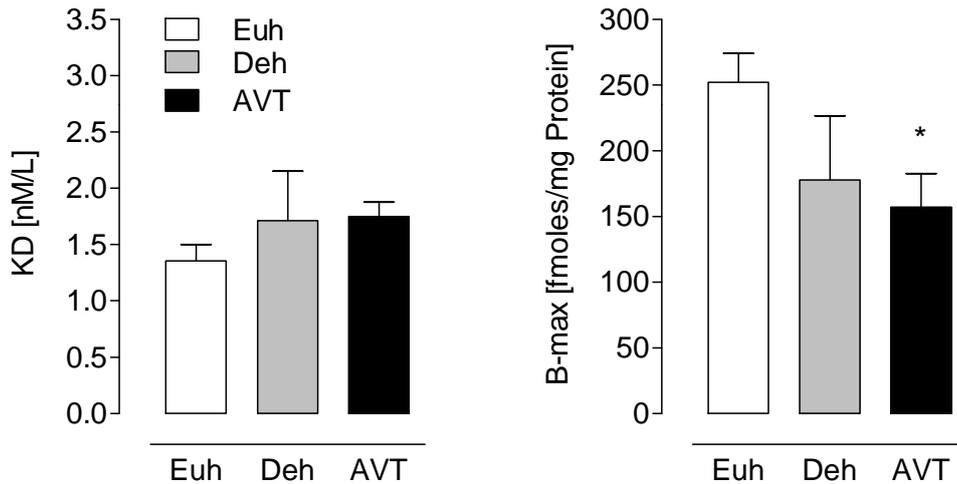


**Abb. 30 : Scatchard-Analyse der Radioliganden-Bindung an isolierten Plasmamembranen der Hühnerniere: Beispiel.**

**Oben :** Exemplarische Darstellung einer Rezeptor-Liganden Bindungskurve mit Auftragung der Menge an Rezeptor-Ligand Komplex (<sup>3</sup>H]AVP gebunden) gegen die jeweilige Konzentration an freiem Radioligand (<sup>3</sup>H]AVP ungebunden). Durch Subtraktion der unspezifischen Bindung (NSB = grün) von der Gesamtbindung (TO = blau) erhält man die spezifische Bindung des Radioliganden (SB = rot) in Form einer Sättigungskurve mit asymptotischer Annäherung an eine parallel zur x-Achse verlaufenden Gerade. Für alle Messpunkte wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt und diese als Mittelwerte dargestellt.

**Unten :** Exemplarische Darstellung der Daten als Scatchard-Plot, der sich aus der Auftragung des Quotienten aus gebundenem und freiem Radioliganden (B/F) gegen die jeweilige Konzentration an gebundenem Radioligand (<sup>3</sup>H]AVP gebunden) ergibt. Für alle Messpunkte wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt und diese als Mittelwerte dargestellt, zusammen mit dem errechneten 95 % Vertrauensintervall (GraphPad®Prism 3).





**Abb. 32 : AVT-induzierte Regulation des AVT-spezifischen Rezeptorsystems in der Hühnerniere.**

Statistische Evaluierung der Scatchardanalysen für die Bindung von [<sup>3</sup>H]AVP an eine angereicherte Plasmamembranfraktion der Hühnerniere. Darstellung der Rezeptoraffinität ( $K_D$ , gemessen in nM/L) sowie der Rezeptordichte bezogen auf den Proteingehalt ( $B_{max}$ , gemessen in fmol/mg Protein) für die drei Versuchstiergruppen [euhydrierte Kontrolltiere (Euh), Versuchstiere nach endogener Stimulation des AVT-Systems durch 40-stündigen Entzug des Trinkwassers (Deh) sowie Hühner mit exogener Applikation von AVT (5 ng/min/kg KG für 30 min i.v.) (AVT)].

Alle Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (S.E.M.) von 6 - 7 Tieren. Statistischer Vergleich mittels Wilcoxon-Mann-Whitney Rangtest und Signifikanzniveau von  $2P \leq 0,05$  (\*).

**Abb. 31 : Vergleichende Scatchard-Analysen für die drei untersuchten Tiergruppen : Beispiele.**

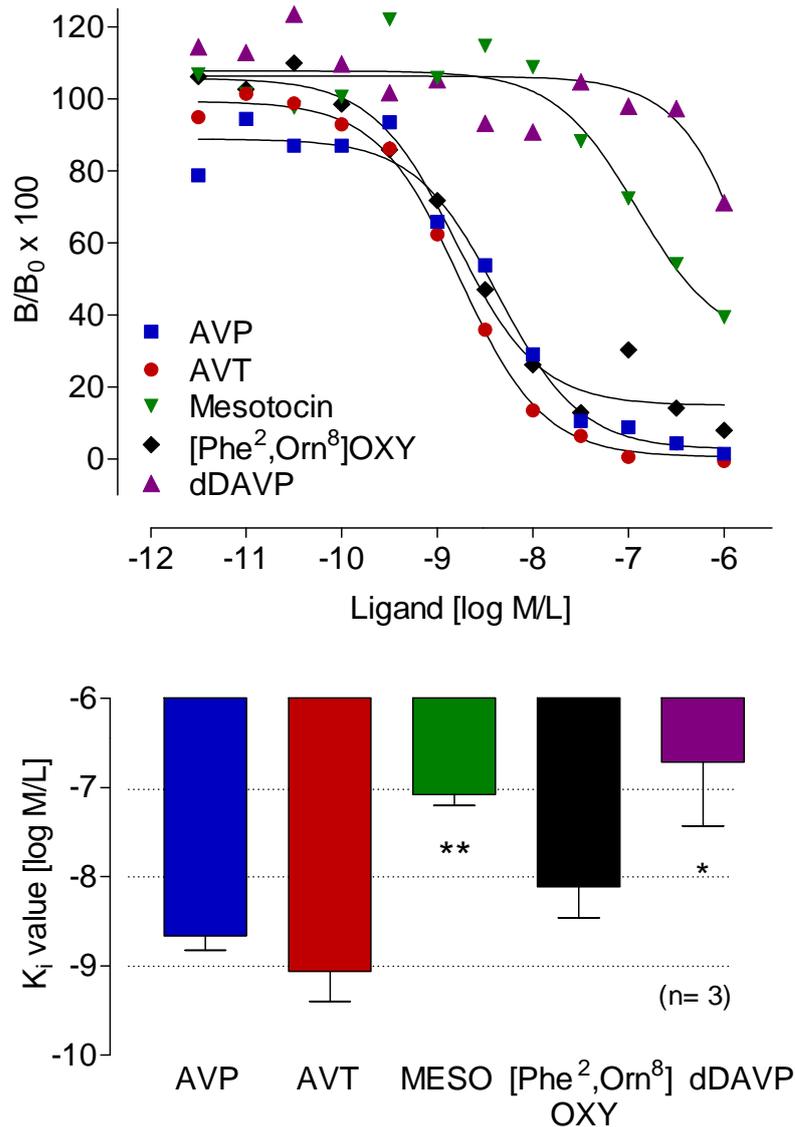
Darstellung der Scatchard-Plots exemplarisch jeweils für eine der drei Versuchstiergruppen [Euhydrierte Kontrolltiere (Euh = euhydriert), Hühner nach endogener Stimulation des AVT-Systems durch 40-stündigen Wasserentzug (Deh = dehydriert) sowie nach exogener Stimulation durch AVT-Infusion (5 ng/min/mg KG für 30 min) (AVT = AVT-Infusion)]. Die Scatchard-Plots ergaben sich durch Auftragung des Quotienten aus gebundenem und freiem Radioliganden (B/F) gegen die Konzentration an gebundenem Radioliganden ([<sup>3</sup>H]AVP gebunden). Die errechneten Regressionsgeraden sind mit ihrem 95 % Vertrauensbereich dargestellt.

Für alle Messpunkte wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt und diese als Mittelwerte dargestellt.

Dies konnte durch die statistische Analyse der Daten aller drei Versuchstiergruppen bestätigt werden (Abb. 32). Mit mittleren  $K_D$ -Werten von  $1,4 \pm 0,1$  nM/L für die euhydrierte Kontrollgruppe,  $1,7 \pm 0,4$  nM/L für die dehydrierten Tiere und  $1,7 \pm 0,1$  nM/L für die Hühner, welche einer systemischen Infusion mit AVT unterzogen wurden, ergaben sich bei Anwendung des nicht-parametrischen Wilcoxon-Mann-Whitney Rangtests (Sachs, 2004) keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Versuchstiergruppen (Abb. 32, links). Hinsichtlich der  $B_{max}$ -Werte hingegen errechnete sich, bezogen auf den Gesamtproteingehalt der jeweiligen Membranfraktionen, eine signifikante ( $2P \leq 0,05$ ) Reduktion der Rezeptordichte für das vogelspezifische, antidiuretische Hormon aufgrund einer exogenen Erhöhung der zirkulierenden Konzentration an AVT. Tendenziell konnte auch für die dehydrierten Hühner eine AVT-induzierte Down-Regulation des AVT-rezeptiven Systems aufgezeigt werden. So erwies sich die Rezeptordichte ( $B_{max}$ ) bei den dehydrierten Tieren mit Werten von  $178 \pm 49$  fmoles/mg Protein gegenüber denjenigen für euhydrierte Kontrolltiere ( $252 \pm 22$  fmoles/mg Protein) als nicht signifikant, die bei den mit AVT stimulierten Tieren mit  $157 \pm 26$  fmoles/mg Protein als signifikant ( $2P \leq 0,05$ ) um etwa 40 % vermindert (Abb. 32, rechts).

### ***3.5.2. Charakterisierung des AVT-Rezeptor Subtyps in der Hühnerniere durch kompetitive Verdrängungsstudien***

Die mit einer angereicherten Plasmamembranfraktion der Hühnerniere durchgeführten kompetitiven Verdrängungsexperimente, bei welchen unmarkiertes AVP, AVT, Mesotocin (= [Ile<sup>8</sup>]Oxytocin), der  $V_1$ -Rezeptor spezifische Agonist [Phe<sup>2</sup>, Orn<sup>8</sup>]Oxytocin sowie der klassische  $V_2$ -Rezeptor spezifische Agonist dDAVP in einem weiten Konzentrationsbereich von 3 pM/L bis 1  $\mu$ M/L mit 1 nM/L [<sup>3</sup>H]AVP um die membranintrinsischen Bindungsstellen für [<sup>3</sup>H]AVP konkurrierten, ermöglichten die pharmakologische Charakterisierung der postulierten AVT-spezifischen Bindungsstellen hinsichtlich ihrer Subtypenspezifität. Diese Experimente wurden, wie unter Kap. 2.2.2.5.4 beschrieben, durchgeführt. So wurde zur Ermittlung der kompetitiven Verdrängungskurve(n) die in Abwesenheit eines unmarkierten Liganden ermittelte maximale Bindung (=  $B_{max}$ ) des Radioliganden [<sup>3</sup>H]AVP als 100 % gesetzt. Die in Anwesenheit steigender Konzentrationen an unmarkiertem Liganden erhaltenen Bindungsdaten des Radioliganden wurden prozentual auf  $B_{max}$  bezogen und gegen die jeweilige Konzentration an unmarkiertem Liganden aufgetragen.



**Abb. 33 : Kompetitive Verdrängungsstudien zur Charakterisierung des AVT-rezeptiven Systems der Hühnerniere.**

**Oben :** Kompetitive Verdrängung ( $B/B_0$ ) des spezifisch gebundenen Radioliganden [ $^3\text{H}$ ]AVP [ $10^{-9}$  M/L] von einer angereicherten Plasmamembranfraktion der Niere euhydrierter Hühner durch steigende Konzentrationen an unmarkierten Rezeptorliganden (AVP, AVT, Mesotocin, [Phe<sup>2</sup>,Orn<sup>8</sup>] Oxytocin, dDAVP). Für alle Messpunkte wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt und diese als Mittelwerte dargestellt. Analyse des Kurvenverlaufs und Berechnung der  $K_i$ -Werte ([M/L]) durch GraphPad®Prism 3.

**Unten :** Graphische Darstellung der errechneten  $K_i$ -Werte [M/L] als Maß für die Affinität des jeweiligen unmarkierten Liganden für das AVT-rezeptive System der Hühnerniere. AVP = [Arg<sup>8</sup>] Vasopressin, AVT = [Arg<sup>8</sup>] Vasotocin, Meso = Mesotocin, dDAVP = V<sub>2</sub>-R Agonist, [Phe<sup>2</sup>, Orn<sup>8</sup>] Oxytocin = V<sub>1</sub>-R Agonist. Alle Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (S.E.M.) von 3 Versuchen mit jeweiliger Dreifachbestimmung. Statistischer Vergleich mittels Wilcoxon-Mann-Whitney Rangtest und Signifikanzniveau von  $2P \leq 0,05$  (\*) und  $2P \leq 0,01$  (\*\*).

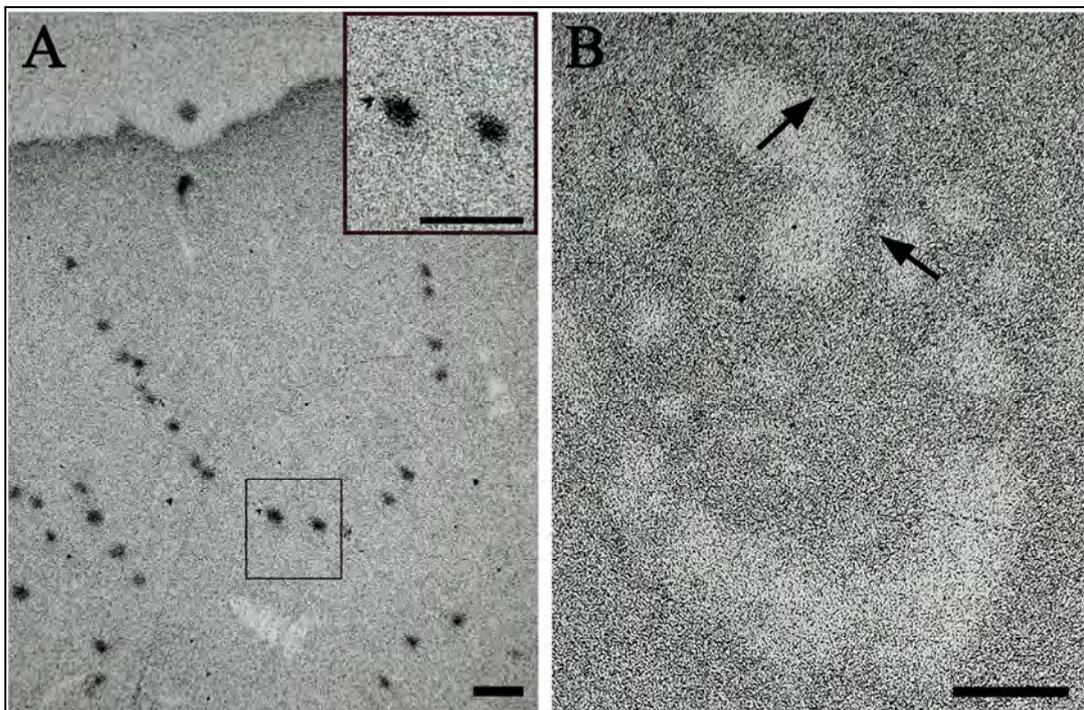
In allen drei durchgeführten Versuchsreihen ergab sich für AVT, AVP, Mesotocin sowie den V<sub>1</sub>-Agonisten [Phe<sup>2</sup>, Orn<sup>8</sup>]Oxytocin ein jeweils sigmoidaler Verlauf der kompetitiven Verdrängungskurven bis, oder nahezu bis, auf den Nullprozentwert spezifischer Bindung des Radioliganden [<sup>3</sup>H]AVP, exemplarisch dargestellt für einen der Versuche in Abb. 33, oben. Der V<sub>2</sub>-spezifische Agonist dDAVP hingegen vermochte selbst in einer Konzentration von 10<sup>-6</sup> M/L den Radioliganden (10<sup>-9</sup> M/L [<sup>3</sup>H]AVP) nur zu maximal 40 % vom AVT-rezeptiven System der Hühnerniere zu verdrängen (Abb. 33). Im statistischen Vergleich zeigte das vogelspezifische antidiuretische Hormon (AVT) mit einem K<sub>I</sub>-Wert (= etwa dem IC<sub>50</sub>-Wert entsprechend) von 10<sup>-9,1</sup> M/L die höchste Potenz, [<sup>3</sup>H]AVP von seinen Bindungsstellen zu verdrängen, gefolgt von AVP mit einem gemittelten IC<sub>50</sub>-Wert von 10<sup>-8,7</sup> M/L. Mesotocin als vogelspezifisches Oxytocin analog wies eine weitaus geringere Affinität für die mit [<sup>3</sup>H]AVP besetzten renalen Bindungsstellen auf, mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 10<sup>-7,1</sup> M/L, also signifikant (2P ≤ 0,01) etwa 100-fach höher als der für AVT berechnete. Interessanterweise demonstrierte der V<sub>1</sub>-R spezifische Agonist [Phe<sup>2</sup>, Orn<sup>8</sup>]Oxytocin mit einem mittleren IC<sub>50</sub>-Wert von 10<sup>-8,1</sup> M/L eine beachtliche Potenz, mit [<sup>3</sup>H]AVP um die Bindungsstellen in der angereicherten Plasmamembranfraktion der Hühnerniere zu konkurrieren. Die signifikant (2P ≤ 0,05) geringste Affinität zeigte der V<sub>2</sub>-Agonist dDAVP mit einer durch GraphPad®Prism3 berechneten halbmaximalen Verdrängungskonstante von 10<sup>-6,7</sup> M/L (Abb. 33, unten). Die in kompetitiven Verdrängungsstudien eingesetzten AVT-Analoga lassen sich somit hinsichtlich ihrer Affinität für das mit [<sup>3</sup>H]AVP markierte, putative AVT-rezeptive System der Hühnerniere wie folgt in einer Affinitätsreihe anordnen, wodurch klare Unterschiede zum für die Säugerniere vorherrschenden V<sub>2</sub>-Rezeptorsubtyp deutlich werden :



### 3.5.3. Autoradiographische Darstellung der spezifischen renalen [<sup>3</sup>H]AVP Bindung

Die Technik der *in vitro* Rezeptorautoradiographie ermöglichte die morphologische Lokalisation [<sup>3</sup>H]AVP spezifischer Bindungsstellen in unfixierten Kryostatschnitten der Hühnerniere mit einer räumlichen Auflösung von etwa 15 µm. Die vollständige, kompetitive Verdrängung des Radioliganden (3 nM/L) durch unmarkiertes, vogelspezifisches AVT (10<sup>-6</sup> M/L) diente dabei als Hinweis auf die Spezifität der radioaktiven Markierung. Die spezifische Bindung des Radioliganden konnte am augenfälligsten und in hoher optischer

Dichte des Autoradiogramms für die perlschnurartig angeordneten RT-Glomerula nachgewiesen werden, welche in räumlicher Assoziation hufeisen- bzw. ellipsenförmig um die jeweils zentralen *Vv. intralobulares* einzelner Pilzkörper der Hühnerniere angeordnet waren (Abb. 34). In weitaus schwächerer Ausbildung konnte eine spezifische, durch AVT ( $10^{-6}$  M/L) vollständig verdrängbare Radiomarkierung für das Epithel corticaler wie auch medullärer Sammelrohre demonstriert werden (Abb. 34). Proximale und distale Tubulussegmente sowie MT-Glomerula wiesen keine Bindung des Radioliganden auf.



**Abb. 34 : Lokalisation [ $^3\text{H}$ ]AVP markierter Bindungsstellen in der Hühnerniere.** Rezeptorautoradiogramme unfixierter Kryostatschnitte ( $10\ \mu\text{m}$ ) der Hühnerniere nach Inkubation mit  $3\ \text{nM/L}$  [ $^3\text{H}$ ]AVP zeigen eine spezifische, durch unmarkiertes AVT ( $10^{-6}$  M/L) vollständig verdrängbare Markierung nahezu aller RT-Glomerula mit hufeisen- bzw. ellipsenförmiger Anordnung (A) sowie des Epithels einzelner Sammelrohre eines medullären Markkegels (Pfeile) (B).

Die Länge aller Balken entspricht  $100\ \mu\text{m}$ .

## 4. KAPITEL Diskussion

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung erhöhter Plasmaspiegel an vogelspezifischem, antidiuretischen Hormon (AVT) für die renale AVT-Rezeptordichte, die intrazelluläre Bildung des *second messenger* Moleküls cAMP sowie vor allem die mögliche Translokation von präformierten Aquaporin-2 Wasserkanälen (AQP-2) aus dem Zytosol in die Plasmamembran spezifischer Nierenepithelzellen am Beispiel des Huhnes zu erarbeiten.

### 4.1. Regulation der aviären AVT-Freisetzung

Bei euhydrierten Vögeln beträgt - je nach Spezies - die zirkulierende AVT-Konzentration im Plasma zwischen 2 und 30 pg/ml. In der vorliegenden Arbeit wurde für das Huhn mittels eines AVT-spezifischen RIAs unter euhydrierten Kontrollbedingungen bei Plasmaosmolalitäten von  $301,0 \pm 3,5$  mOsm/kg eine mittlere Plasmakonzentration an AVT von  $10,4 \pm 3,6$  pg/ml gemessen. Mit 4 - 6 pg/ml [Koike *et al.*, 1977], etwa 20 pg/ml [Jaccoby *et al.*, 1997] sowie 10 - 13 pg/ml [Stallone and Braun, 1986a, b] wurden vergleichbare Werte von anderen Autoren für das Huhn publiziert; lediglich RIA-Bestimmungen von Saito und Mitarbeitern [2001] wiesen deutlich erhöhte basale Plasmakonzentrationen auf, was möglicherweise auf das geringe Alter der Küken (4 Tage) und das stressvolle Prozedere des Versuchsansatzes zurückzuführen war. Hinsichtlich anderer Vogelarten konnten folgende Plasmawerte ermittelt werden: 4 - 8 pg/ml für die Stockente [Gray und Simon, 1983, 1987; Simon-Oppermann *et al.*, 1984; Gray und Maloney, 1998], 14 - 20 pg/ml für Säufertauben [Giladi *et al.*, 1997], 20 - 30 pg/ml für den Hausspatz [Goldstein und Braun, 1988] sowie 5 - 30 pg/ml für die Japanische Wachtel bzw. die Virginiawachtel [Goldstein, 1995; Chaturvedi *et al.*, 2000; Seth *et al.*, 2004a] und 10 - 12 pg/ml für drei Meeresvögel, nämlich Dominikanermöwe (*Larus dominicanus*), Kaptölpel (*Morus capensis*) und Brillenpinguin (*Spheniscus demersus*) [Gray und Erasmus, 1988b].

Die Freisetzung des antidiuretischen Hormones AVT aus dem Hypophysenhinterlappen des Vogels wird durch einen Anstieg der Tonizität in der extrazellulären Flüssigkeit bei Dehydratation, Salzbelastung oder Hitzestress des Tieres, sowie eine Reduktion des extrazellulären Flüssigkeitsvolumens (EZFV) etwa nach Hämorrhagie oder Diarrhö induziert. In

der afferenten Übermittlung dieser Signale spielen neben osmo- bzw. volumen- oder drucksensorischen freien Nervenendigungen des Niederdrucksystems vor allem peptiderge Hormone wie Angiotensin II oder Steroidhormone eine Rolle [Simon *et al.*, 1992; Gerstberger, 1997; Gerstberger *et al.*, 1997].

Unter experimentellen Bedingungen der Dehydratation - üblicherweise induziert durch Entzug des Trinkwassers für 24 Stunden bis zu fünf Tage - wurde wiederum speziesabhängig eine markante Erhöhung der zirkulierenden Konzentration an AVT dargestellt. So bewirkte in der vorgelegten Arbeit der für 40 Stunden durchgeführte Wasserentzug eine Erhöhung der mittleren AVT-Plasmakonzentration auf  $38,2 \pm 10,8$  pg/ml. Wie in anderen Untersuchungen berichtet, kann generell von einer linearen Beziehung zwischen Plasmaosmolalität (mOsm/kg) und AVT-Konzentration (pg/ml) ausgegangen werden [Möhring *et al.*, 1980; Gray und Simon, 1983]. Somit ergab sich für die afferente Signalübertragung osmotischer Stimuli (Zunahme der Plasmaosmolalität von 301 auf 337 mOsm/kg) an das hypothalamo-hypophysäre System [Gerstberger *et al.*, 1997] eine Sensitivität von 0,77 pg/ml pro mOsm/kg [Mütze *et al.*, 2008]. Stallone und Braun [1986a] publizierten für das Huhn Werte um 1,3 und Koike und Mitarbeiter [1977] von 0,5 pg/ml pro mOsm/kg. Parallel zu einer gesteigerten Freisetzung von neurohypophysärem AVT induzierte Dehydratation für 2 - 4 Tage beim Huhn bzw. vier Tage bei der Wachtel eine signifikant erhöhte Expression an AVT-spezifischer mRNA in den magno- nicht jedoch parvozellulären Komponenten des hypothalamischen *Nucleus paraventricularis* (PVN) [Chaturvedi *et al.*, 1994; 2000].

Bei der Stockente bedingte eine ansteigende Plasmaosmolalität infolge erhöhter extrazellulärer Natriumkonzentration während der Dehydratation einen linear korrelierten Anstieg des Plasma-AVT bei einer Sensitivität von 0,3 - 1,0 pg/ml pro mOsmol/kg [Gray und Simon, 1983], und für die Japanische Wachtel konnten mit 0,4 - 0,7 pg/ml pro mOsm/kg vergleichbare Werte erzielt werden [Chaturvedi *et al.*, 2000; Seth *et al.*, 2004a]. Gray und Erasmus [1988b] untersuchten die Osmoregulation des AVT-Systems für Vogelarten, welche an ästuare oder marine Habitate angepasst waren, und somit neben den Nieren über supraorbitale Salzdrüsen als osmoregulatorische Effektororgane verfügen [Gerstberger und Gray, 1993], wie Dominikanermöwe (I), Kaptöpel (II) und Brillenpinguin (III). Nach

einer Dehydratationsphase von zwei (I) bzw. 3 - 5 Tagen (II und III) stiegen sowohl die gemessenen Plasmaosmolalitäten als auch AVT-Spiegel signifikant an, bei gleich bleibendem (I, II) bzw. erhöhtem Hämatokritwert (III). Für alle drei Spezies bestand dabei eine positive Korrelation zwischen Plasmaosmolalität und AVT-Konzentration, mit höherer Sensitivität der AVT-Freisetzung bei den Dominikanermöwen (1,1 pg/ml pro mOsm/kg) im Vergleich zu den Kaptölpeln bzw. Brillenpinguinen (0,3 - 0,5 pg/ml pro mOsm/kg).

Sowohl auf mRNA- als auch Peptidhormon-Ebene liegen für das Huhn nach peripherer osmotischer Stimulation durch die Applikation hyperosmolaler NaCl-Lösungen zu den Dehydratations-Versuchen vergleichbare Daten vor. Hinsichtlich des Zeitverlaufes der osmotisch induzierten AVT-Synthese und -Freisetzung zeigten Untersuchungen an Hühnern mit Dauerinfusion einer hypertonen 1,5 M/L NaCl-Lösung, dass ein Anstieg der AVT-Plasmakonzentration auf mehr als das Doppelte schon während der ersten fünf min verzeichnet werden konnte, mit Erreichen eines Peaks nach 30 min [Leary *et al.*, 1998; Saito *et al.*, 2001]. In einer weiteren Studie konnte ebenfalls demonstriert werden, dass die intraperitoneale Injektion einer 3,0 M/L NaCl-Lösung innerhalb von 60 min sowohl eine stimulierte Sekretion des Hormons in die Blutbahn, als auch eine gesteigerte *de novo* Synthese an AVT im Hypothalamus des Huhnes in enger Korrelation zur Induktion des Transkriptionsfaktors c-Fos in AVT-produzierenden, magnozellulären Neuronen des PVN hervorrief [Jacoby *et al.*, 1997, 1999]. Durch die intracerebroventrikuläre Applikation einer AVT mRNA -spezifischen Antisense Oligodeoxynukleotid-Sonde konnten Saito und Mitarbeiter [2001] zudem nachweisen, dass die osmotisch induzierten, signifikant erhöhten Plasmaspiegel an AVT bei 4-tägigen Küken zumindest teilweise auf einer gesteigerten *de novo* Synthese des Hormons beruhen. Im Vergleich zur raschen Antwort der Tonizitäts-induzierten AVT-Freisetzung wird für die hypothalamische Genexpression (AVT mRNA) beim Huhn dennoch von einer längeren Zeitkonstante ausgegangen, da erste Signale einer erhöhten Expression von c-Fos 30 min [Sharp *et al.*, 1995] sowie des erst kürzlich entdeckten „tonicity-responsive enhancer binding protein“ (Ton-EBP) und AVT-spezifischer mRNA erst 60 min nach systemisch-osmotischer Stimulation nachzuweisen waren [Saito *et al.*, 2010]. Bei der Ratte wurde eine schnelle Gentranskriptionsaktivität anhand erhöhter AVP-spezifischer Level an heteronukleärer RNA im SON und PVN schon 10 min nach hyperosmotischer Stimulation beobachtet [Arima *et al.*, 1999]; vergleichbare Untersuchun-

gen etwa für das Huhn stehen noch aus. Studien zur Freisetzung des AVT bei Hühnern, welche einer salzarmen Diät ausgesetzt waren, zeigten eine signifikant höhere Sensitivität der AVT-Freisetzung im Vergleich zu Hühnern, denen ein Futter mit höherem NaCl-Gehalt verabreicht wurde [Arad und Skadhauge, 1984]. In der hier vorgelegten Arbeit waren alle drei Versuchstiergruppen identischen Fütterungsbedingungen auch hinsichtlich des NaCl-Gehaltes ausgesetzt. Auch bei der oben schon erwähnten Dominikanermöwe als mariner Vogelspezies führte eine externe Salzbelastung in Form einer zweistündigen, hypertonen NaCl-Infusion zu einem signifikanten Anstieg der Plasmaosmolalität und der AVT-Plasmakonzentration [Gray und Erasmus, 1989]. Äquimolare Lösungen an Mannitol, nicht jedoch Harnstoff, hatten ebenfalls eine Erhöhung an zirkulierendem AVT zur Konsequenz, was auf die Osmolalität des Plasmas als entscheidenden Faktor hinweist.

Dehydratation bedingt neben einer Erhöhung der Osmolalität sowie Natriumkonzentration des Plasmas in den meisten Fällen auch eine Reduktion des EZFV<sub>s</sub>, am leichtesten ablesbar an der Zunahme des Hkt-Wertes im Vollblut, wie auch in der vorliegenden Arbeit für das Huhn dargestellt. Eine offensichtlich tierartlich unterschiedliche Reaktion des AVT-Systems existiert bei einem Blutvolumenverlust. Während beim Huhn eine hypovolämische Komponente zur Beeinflussung des AVT-Systems nahezu ausgeschlossen wird [Koike *et al.*, 1980; Nouwen *et al.*, 1984; Stallone und Braun, 1986a], schreibt man sowohl der Stockente [Simon-Oppermann *et al.*, 1980, 1984; Simon-Oppermann und Simon, 1982] als auch der Dominikanermöwe [Gray und Erasmus, 1989] eine Reaktion des AVT-Systems nach Hämorrhagie zu. Gemäß der für Säugetiere ermittelten „Sprungfunktion“ der AVP-Plasmakonzentration bei extrazellulärer Hypovolämie erfolgte auch bei der Möwe bis zu einem 10 % Blutvolumenverlust lediglich ein marginaler Plasma-AVT Anstieg, der jedoch bei gesteigerter Hämorrhagie signifikant zunahm [Gray und Erasmus, 1989]. Das komplexe Renin-Angiotensin System (RAS) des Vogels wird in erster Linie unter Bedingungen einer extrazellulären Hypovolämie aktiviert und führt zur vermehrten Bildung des Oktapeptids Angiotensin II (AngII) als bioaktivem Endprodukt des RAS [Simon *et al.*, 1992]. Während zentralnervös gebildetes AngII - ähnlich wie bei Säugern – bekanntermaßen auch bei Hühnern, Enten und Tauben Durst erzeugt, die AVT Freisetzung stimuliert und zur arteriellen Vasokonstriktion führt [Evered und Fitzsimons, 1981; Gerstberger *et al.*, 1984a; Simon *et al.*, 1992; Volmert und Firman, 1992; Fitzsimons, 1998], ist das Bild

für peripher in der Blutbahn gebildetes AngII uneinheitlicher. So konnte für das Huhn bei intravenöser AngII Infusion (2 - 200 ng/min/kg KG) eine dosis-abhängige Freisetzung von AVT in die Blutbahn nachgewiesen werden [Goto *et al.*, 1986; Volmert und Firman, 1992]. Studien an der Dominikanermöwe bzw. der Stockente erbrachten erst bei sehr hohen Dosen von 50 - 200 ng/min/kg BW lediglich marginale (Möwe) bzw. keine (Ente) Stimulation der neurohypophysären AVT-Sekretion [Gray und Erasmus, 1989; Simon und Schmid, 1996].

Einen weiteren möglichen hormonalen Einfluss auf das aviäre AVT-System stellen Sexualsteroide wie Östradiol- bzw. Testosteronderivate dar. So konnte in Untersuchungen an weiblichen japanischen Wachteln gezeigt werden, dass diese Steroide zwar nicht die durch Dehydratation induzierte AVT-Freisetzung, wohl aber die Menge an AVT-spezifischen mRNA Transkripten in Zellen des PVN und *Nucleus supraopticus* (SON) zu vermehren vermochten, also als klassische, modulatorische Neurosteroiden wirkten [Seth *et al.*, 2004a]. Die markantesten Änderungen der AVT-Plasmakonzentration, der AVT-Genexpression im Hypothalamus sowie der möglicherweise Prostaglandin F<sub>2α</sub>-bedingten Expression des VT<sub>1</sub>-Rezeptors für AVT in der Schilddrüse wurden beim Huhn zum Zeitpunkt der Oviposition festgestellt [Takahashi *et al.*, 1994; Sasaki *et al.*, 1998; Seth *et al.*, 2004b]. So stiegen die AVT-Plasmawerte nach vollendeter Oviposition transient um das 5 - 6 fache an, bei gleichzeitiger Reduktion des neurohypophysären AVT-Speichers [Arad und Skadhauge, 1984; Tanaka *et al.*, 1984; Koike *et al.*, 1988; Sasaki *et al.*, 1998]. Um in der vorliegenden Arbeit falsch-positive Erhöhungen der AVT-Plasmakonzentration etwa durch eine bevorstehende Oviposition zu verhindern, wurden daher ohne Ausnahme ausschließlich juvenile weibliche Hühner vor Einsetzen der ersten Oviposition in die Versuche einbezogen.

Bei euhydrierten Hühnern mit freiem Zugang zu Trinkwasser wirkte sich Hitzestress weder auf die Plasmaosmolalität noch auf die AVT-Konzentration des Plasmas aus. Die Kombination des Hitzestresses mit Dehydratation induzierte jedoch eine deutliche Verstärkung des durch Hypernaträmie alleine registrierten Effekts auf die AVT-Freisetzung [Arad und Skadhauge, 1984]. Kisliuk und Grossmann [1994] führten Untersuchungen zum Einfluss der relativen Luftfeuchtigkeit auf das aviäre AVT-System während der Inkubation bei Hühnerembryonen durch. Im Verlauf der ontogenetischen Reifung des hypothalamo-

neurohypophysären AVT-Systems verursachte die Inkubation der befruchteten Eier bei 32 - 35 % anstelle der normalen 58 - 62 % Luftfeuchte eine signifikante Erhöhung der im Embryo zirkulierenden AVT-Plasmakonzentration. Die genannten klimatischen Faktoren spielten in Versuchen der vorliegenden Arbeit keine Rolle, da für alle adulten Versuchstiere gleichbleibende klimatische Bedingungen herrschten. Untersuchungen zur AVT-Plasmakonzentration bei der Säufertaube während eines fünfständigen Fluges in der israelischen Wüste ergaben einen 3 - 8 fachen Anstieg der Plasma-AVT-Konzentration bei positiver Korrelation zur Umgebungstemperatur [10°C im Winter (niedrige AVT-Level), 23 - 25°C im Sommer (hohe AVT-Level)] sowie eine Erhöhung der Plasmaosmolalität um 26 - 39 mOsm/kg bei nahezu unverändertem, wenn nicht sogar leicht erniedrigtem Hämatokritwert [Giladi *et al.*, 1997]. Die normalerweise lineare Korrelation zwischen der Plasmaosmolalität und der AVT-Plasmakonzentration traf bei fliegenden Säufertauben nicht zu, was auf eine Osmolalitäts-unabhängige Stresskomponente bei der Regulation der AVT-Freisetzung während des Fluges hinweisen könnte.

Um den möglichen Einfluss von Anästhetika auf die Plasmawerte für AVT abzuklären, analysierten Bottje und Mitarbeiter [1990] Hormonwerte im Rahmen einer Barbituratbehandlung und konnten zeigen, dass während der Narkose und für bis zu 27 Stunden *post injectionem* keine Veränderungen der AVT-Plasmakonzentration beim Huhn zu verzeichnen waren. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Gerstberger [1983] für die Stockente sowohl für die Pentobarbital-, als auch Halothan-N<sub>2</sub>O-O<sub>2</sub> Inhalationsnarkose berichtet. In der vorliegenden Arbeit wurde Pentobarbital erst unmittelbar vor der transkardialen Perfusion zum Zweck der Narkose eingesetzt, wodurch eine Beeinflussung der AVT-Werte nahezu ausgeschlossen werden kann.

#### **4.2. Renale Wirkungen des AVT bei Vögeln**

Die renale Wirkung des AVT, d.h. das die Reduktion der relativen osmolalen Clearance ( $C_{Osm}/C_{Inulin}$ ) sowie vor allem der freien Wasserclearance ( $C_{Wasser}/C_{Inulin}$ ) wird als wichtiger Mechanismus zur hormonal geregelten Konzentrierung des Endharns bei Vögeln angesehen [Bradshaw, 1997]. Im Rahmen der Homöostase des Salz- und Wasserhaushaltes mariner sowie nicht-mariner Vogelspezies besteht die wichtigste Funktion des neurohypophysären Peptidhormones AVT also darin, die renale Wasserausscheidung etwa unter Bedin-

gungen einer extrazellulären Hypovolämie bzw. Hypernaträmie zu minimieren [Sturkie, 1976; Goldstein, 2006]. Dabei konnten detaillierte Untersuchungen an Hühnern und Stockenten zeigen, dass AVT den Effekt der Antidiurese sowohl mittels vaskulärer als auch tubulärer Wirkmechanismen hervorrief, d.h. dass AVT sowohl die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) reduzierte als auch die tubuläre Wasserresorption steigerte [Skadhauge, 1981; Gerstberger *et al.*, 1985; Stallone und Braun, 1985; Brummermann und Braun, 1995].

#### **4.2.1. AVT-Wirkung auf die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) der Vogelniere**

Osmotischer Stress, welcher zu einer stimulierten Freisetzung von AVT in die Blutbahn führt, ist oft mit einer Abnahme der renalen GFR assoziiert. Dabei wurde als osmotischer Stimulus zur endogenen Freisetzung neurohypophysären AVTs entweder der Entzug des Trinkwassers (wie in der vorliegenden Arbeit), oder die systemische Applikation hypertoner Salzlösungen, vor allem NaCl, herangezogen. Bei durch akute Dehydratation (30 Stunden) bzw. längerfristigem Trinkwasserentzug (vier Tage) markant erhöhten Plasmaspiegeln an AVT bei Virginiawachteln (*Colinus virginianus*) ließ sich die reduzierte Urinflussrate sowohl auf eine etwa 50 % Reduktion der Gesamt-GFR als auch gleichwertige Zunahme der tubulären Wasserresorption zurückführen [Goldstein, 1995].

Die Infusion einer hyperosmolalen NaCl-Lösung bei Staren bewirkte keine Änderung der Gesamt-GFR [Braun, 1978] und eine vergleichbare Beobachtung konnte bei verwilderten Hühnern vollzogen werden [Roberts, 1992]. Untersuchungen am domestizierten Huhn betreffend, vertraten Skadhauge und Schmidt-Nielsen [1967a] die Meinung, dass eine hypertone NaCl-Infusion keine eindeutige Wirkung auf die GFR bei Hähnen besitzt, wohingegen eine stark abfallende GFR bei Hennen sowie einigen Wachtelarten nachgewiesen werden konnte [Dantzler, 1966, Braun und Dantzler, 1972]. Diese gegensätzlichen Ergebnisse waren vermutlich aufgrund des Einsatzes verschieden stark konzentrierter NaCl-Lösungen zustande gekommen. Dass Applikationen hypertoner Salzlösung keinen geeigneten Versuchsansatz zur Klärung glomerulärer *versus* tubulärer Wirkkomponenten von endogenem AVT bei renaler Antidiurese darstellen, geht auch aus der Arbeit von Leary *et al.* [1998] an Hühnern hervor. So konnte gezeigt werden, dass während der intravenösen Dauerinfusion (0,2 ml/min/kg KG) einer 1,0 M/L NaCl-Lösung der Hkt-Wert signifikant abfiel, bei ausgeprägter Zunahme der Plasmaosmolalität. Die systemische Infusion einer

hypertonen Salzlösung hatte offensichtlich - osmotisch bedingt - eine Hypervolämie der extrazellulären Flüssigkeit hervorgerufen, welche ihrerseits zu einer Zunahme der GFR führte bzw. die AVT-induzierte Reduktion der GFR kompensierte. Die durch extrazelluläre Hypertonizität im Plasma bedingte Freisetzung von AVT mit nachfolgender Wirkung auf die *Vasa afferentia* könnte durch die gleichzeitig stattfindende Wasserverschiebung aus dem Intra- in den Extrazellularraum zu einer der AVT-Wirkung entgegengerichteten, möglicherweise ANP-bedingten, Erhöhung der GFR geführt haben.

Die exogene Verabreichung von AVT jedoch verursachte beim Huhn dosisabhängig eine partielle Konstriktion der präglomerulären *Vasa afferentia* und folglich einen reduzierten postglomerulären Blutfluss. Durch diese Konstriktion der präglomerulären Arteriolen wurde darüber hinaus der hydrostatische Druck in den glomerulären Kapillarschlingen vermindert und somit die GFR und letztendlich die Menge des Endharns reduziert. Dieser Effekt des AVT erwies sich für das Huhn als dosisabhängig [Stallone und Braun, 1985]. Mit Hilfe der Polyethylenglycol (PEG)-Technik gelang es Goecke und Goldstein [1997], selbst bei einem so kleinen Vogel wie dem Spatz, vaskuläre und tubuläre Wirkungen des AVT an der Niere zu differenzieren. Unter den experimentellen Bedingungen einer durch 25 mM/L NaCl Dauerinfusion erzeugten, konstanten Diurese bewirkte die systemische Infusion des antidiuretischen Hormones (0,4 - 1,6 ng/min/kg KG) eine dosisabhängige Reduktion der Urinflussrate sowie GFR bei erhöhter Urinosmolalität. Auch an wachen, Salzwasser-adaptierten Stockenten [Gerstberger *et al.*, 1985; Gerstberger, 1997] sowie Dominikanermöwen [Gray und Erasmus, 1988a] durchgeführte Untersuchungen mit intravenöser Infusion von AVT in physiologischen Dosen (0,1 - 5 bzw. 0,03 - 1,0 ng/min/kg KG) verursachten bei konstanter basaler Nierenaktivität eine dosisabhängige Reduktion der Gesamt-GFR auf maximal 40 % bzw. 60 % der Ausgangswerte. Interessanterweise berichteten Holmes und Mitarbeiter [1968] sowie Hughes [1980] über nicht-signifikante Unterschiede der GFR zwischen Salzwasser- und Frischwasser-adaptierten Stockenten, trotz ausgeprägt erhöhter Plasmatonizität der ersten Gruppe. In der Literatur existieren variable Angaben bzgl. der AVT-induzierten Reduktion der GFR, welche 0 - 90% der Basalwerte betragen [Dantzler, 1966; Ames *et al.*, 1971; Braun und Dantzler, 1974; Kaul *et al.*, 1983]. Grund dafür sind augenscheinlich Unterschiede der experimentellen Technik, wie der

Einsatz von Narkotika, welche Blutdruck oder die vaskuläre Reagibilität beeinflussen können, sowie Art und Konzentration der AVT-Applikation.

Die durch AVT induzierte Reduktion der renalen GFR der gesamten Niere könnte dabei, bedingt durch die vogelspezifische renale Zytoarchitektur der verschiedenartigen Nephrontypen, sowohl durch eine Wirkung auf die einfachen Glomerula der RT-Nephronen oder die wesentlich komplexeren Glomerula der MT-Nephronen zurückzuführen sein [Morild *et al.*, 1985a; Wideman, 1988]. Interessanterweise stammen die einzigen bis *dato* vorhandenen experimentellen Studien zu dieser wichtigen Frage ausschließlich aus den 60er und 70er Jahren des letzten Jahrhunderts. Basierend auf physiologischen Studien an der Helmchwachtel (*Callipepla gambelii*) [Braun und Dantzler, 1972, 1974; Braun, 1976], sowie histologischen Untersuchungen zum Aufbau der beiden Nephrontypen der Vogelniere [Skadhauge und Schmidt-Nielsen, 1967a] wurde zunächst die funktionelle Heterogenität zwischen den aviären Nephronpopulationen beschrieben. Untersuchungen an der amerikanischen Helmchwachtel (*Lophortyx gambelii*) konnten schließlich zeigen, dass in Equitesin-narkotisierten Tieren die intravenöse Applikation von 10 - 200 ng AVT pro kg KG unter Bedingungen einer durch Mannitol-Infusion induzierten konstanten Diurese sowohl auf Ebene der gesamten Niere als auch einzelner RT-Nephronen (nicht jedoch der MT-Nephronen) zu einer signifikanten Reduktion der GFR führte [Braun und Dantzler, 1974]. Sowohl die in der vorliegenden Arbeit autoradiographisch mit [<sup>3</sup>H]AVP spezifisch markierten Glomerula der Hühnerniere als auch diejenigen der Entenneniere [Gerstberger *et al.*, 1994; Gerstberger, 1997] ließen sich durch histologische Gegenfärbung der Nierenschnitte als ausnahmslos dem RT-Typ zugehörig charakterisieren.

#### **4.2.2. Wirkungen des AVT auf das Tubulussystem**

Die fraktionelle tubuläre Reabsorption von Wasser liegt in der Vogelniere gewöhnlich bei  $\geq 95$  % des glomerulär filtrierte Volumens, kann jedoch unter Bedingungen einer Maximaldiurese in praktischer Abwesenheit von AVT bis auf Werte von unter 70 % fallen, was gleichzeitig bedeutet, dass nahezu 30 % des filtrierte Wassers unter AVT-er Kontrolle tubulär rückresorbiert werden kann [Goldstein und Bradshaw, 1998]. Frühere Studien an Stockenten, denen eine konstante, intravenöse AVT-Infusion steigender Konzentration im definitiv physiologischen Bereich verabreicht wurde, zeigten klar definierte Beziehungen

zwischen der physiologischen Serum AVT-Konzentration sowie Urinflussrate und -osmolarität [Möhring *et al.*, 1980; Gerstberger *et al.*, 1994]. Durch AVT-bedingte Stimulation der tubulären Resorption konnte darüber hinaus beim Huhn das Urin/Plasma Verhältnis eines geeigneten renalen Filtrationsmarkers wie Inulin zwischen Diurese und Antidiurese um mehr als das 10-fache ansteigen [Stallone und Braun, 1985]. Die offensichtlich tubulären Wirkungen von Vasotocin an der Vogelniere sind somit hinreichend belegt. Während bei signifikant durch systemische Applikation erhöhten AVT-Plasmakonzentrationen des Huhnes der Hormon-induzierten Verringerung der GFR ein wichtiger Anteil an der induzierten Antidiurese der Vogelniere zugeschrieben werden kann, stehen schon bei marginal vermehrtem Plasma-AVT im physiologischen Bereich vor allem die tubulären Effekte des AVT im Vordergrund [Stallone und Braun, 1985]. So ließ sich die AVT-induzierte Reduktion der Wasserekkretion schon bei AVT-Plasmakonzentrationen des Huhnes von  $\leq 20$  pg/ml nachweisen, während glomeruläre Effekte von etwa 30 % der Gesamtwirkung erst bei höheren Konzentrationen zu verzeichnen waren. Nishimura und Mitarbeiter [1984] konnten in Übereinstimmung dazu demonstrieren, dass die marginale Erhöhung der Plasma Natriumkonzentration um lediglich drei mEq/L durch Infusion einer 10 % NaCl-Lösung eine ausgeprägte Antidiurese ohne Änderung der GFR zur Folge hatte, also auf rein tubuläre Wirkung der vermutlich erhöhten AVT-Plasmakonzentration zurückzuführen war. Ein Vergleich der dosisabhängigen Verhältnisse zwischen Plasma-AVT und glomerulären bzw. tubulären Mechanismen der Antidiurese zeigte für das Huhn somit eindeutig, dass tubuläre Mechanismen von primärer und glomeruläre Mechanismen von sekundärer Bedeutung für die renale Antidiurese sind [Stallone und Braun, 1985].

Nishimura und Mitarbeiter [1989] veröffentlichten eine Reihe von Studien, in denen sie funktionelle Charakteristika an isoliert-perfundierten aviären medullären Tubuli definierten: So z.B. zeichnet sich der dicke aufsteigende Ast der Henleschleife durch einen aktiven NaCl-Transport (Auswärtsstrom) und eine Wasserimpermeabilität aus [Miwa und Nishimura, 1986; Nishimura *et al.*, 1989]. Die Sammelrohre hingegen weisen eine moderate Wasserpermeabilität auf [Nishimura *et al.*, 1996]. Insgesamt lässt sich daraus folgern, dass ähnlich zum Säugetier ein durch den NaCl-Transport in der aufsteigenden HS angetriebenes Gegenstrommodell existieren muss. Um genauer zu lokalisieren, welche Segmente eines Nephrons sich als AVT-responsiv erweisen, führte Nishimura *et al.*, [1984] experi-

mentelle *in vitro* Untersuchungen am isolierten, dicken aufsteigenden Ast der HS der MT-Nephronen (= TAL) sowie am medullären Sammelrohr (= mSR) der Wachtel *Coturnix coturnix* durch. In Anwesenheit mittlerer bis supraphysiologischer AVT-Konzentrationen ( $2 \times 10^{-9}$  M/L bis  $10^{-6}$  M/L) änderte sich im TAL weder die lumenpositive, Furosemid-sensitive transepitheliale Spannung  $V_t$  und der Nettowasserfluss  $J_v$ , noch die osmotische Wasserpermeabilität  $L_p$ . Dies bedeutet, dass der dicke aufsteigende Ast der HS nicht als Zielstruktur für AVT in Frage kommt und als verdünnendes Segment fungiert [Nishimura *et al.*, 1996]. Im Gegensatz dazu erhöhte sich der Nettowasserfluss  $J_v$  im Bereich der mSRs dehydrierter Wachteln durch AVT in definitiv supraphysiologischer Konzentration ( $10^{-5}$  M/L) um etwa das 5-fache. Als Schlussfolgerung lässt sich festhalten, dass AVT in der Wachtelniere zwar zu einer ansteigenden Wasserpermeabilität der medullären Sammelrohre führte, bei jedoch relativ hoher, basaler Wasserpermeabilität und insgesamt eher bescheidenen Wirkungen des AVT auf den Nettowasserfluss.

#### **4.2.3. Nephrogener Diabetes insipidus beim Vogel**

Beim Säuger beschreibt das Krankheitsbild des *Diabetes insipidus* (DI) die Unfähigkeit der Nieren, einen konzentrierten Endharn mit maximaler Antidiurese zu produzieren. Dabei unterscheidet man im Wesentlichen zwei Formen des DI. Beim zentralen DI ist die Ursache ein Fehlen oder eine unzureichende Produktion des antidiuretischen Hormons ADH im Hypothalamus, ein fehlender Transport des ADH vom Hypothalamus in die Neurohypophyse oder eine reduzierte Sekretion des ADH aus selbiger in die Blutbahn. Der nephrogene DI (= NDI) hingegen beruht auf einer gestörten Ansprechbarkeit der Sammelrohr-epithelzellen auf erhöhtes ADH. Als Hauptursachen für den NDI kommen metabolische Dysfunktionen (z.B. Hypercalcämie, Natriummangel), chronische Nierenerkrankungen, anatomische Störungen (z.B. postobstruktive Diurese), systemische Erkrankungen (z.B. Amyloidose), Medikamentenmißbrauch (z.B. Lithium, Demeclocycline, Amphotericin) sowie in erster Linie kongenitale Erkrankungen (inaktivierende Mutationen des renalen  $V_2$ -Rezeptors für ADH bzw. des AQP-2 Gens) in Frage. Bei Mensch und Ratte lassen sich etwa 95 % aller Fälle von NDI auf eine gestörte Funktion des renalen  $V_2$  Rezeptors für AVP zurückführen, wobei bis *dato* etwa 130 verschiedene Mutationen des Rezeptorproteins bekannt sind und in direktem Zusammenhang mit der Entwicklung eines DI stehen [Oksche und Rosenthal, 1998; Kondo *et al.*, 2006].

Auch bei Geflügelzüchtern sind die sogenannten „wet birds“ bekannt, die eine eingeschränkte Konzentrierungsfähigkeit des Urins aufweisen [Raffel *et al.*, 1976], und DI konnte bis *dato* für Huhn [Obeidah *et al.*, 1977; Braun und Stallone, 1989] und die Japanische Wachtel [Minvielle *et al.*, 2007] beschrieben werden. Braun und Stallone [1989] konnten in einer Linie weisser Leghornhühner die klinischen Symptome des DI nachweisen. So waren Plasmaosmolalität, zirkulierendes AVT sowie die tägliche Wasseraufnahme im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant erhöht, bei stark reduzierter Osmolalität des Endharns. Dehydratation für 48 Stunden induzierte in beiden Tiergruppen eine Erhöhung der AVT-Freisetzung, so dass von einer normal kontrollierten AVT-Synthese in SON und PVN des Hypothalamus ausgegangen werden kann. Die trotz hoher AVT-Plasmakonzentration minimale Urinosmolalität (80 *versus* 530 mOsm/kg) legte das Vorliegen eines nephrogenen DI nahe, und NDI-Hühner reagierten auf hypoosmotische Infusionen mit gesteigertem Urinfluss und verminderter GFR gegenüber den gesunden Kontrolltieren [Brummermann und Braun, 1995]. Die systemische AVT-Applikation (2,5 ng/min/kg KG) führte bei den Kontrolltieren zu einer reduzierten Urinflussrate bei gesteigerter Urinosmolalität, zurückzuführen sowohl auf tubuläre als auch glomeruläre Effekte. DI-Tiere jedoch wiesen eine nur marginal verminderte renale Ausscheidung eines hypotonen Endharns bei erhöhter GFR auf [Brummermann und Braun, 1995] und unterstützen somit indirekt die Bedeutung eines sowohl glomerulären als auch tubulären Wirkmechanismus des AVT.

#### **4.2.4. Vergleichende renale AVT-Wirkung bei Fischen, Amphibien und Reptilien**

Die Beteiligung vaskulärer und/oder tubulärer Mechanismen des Vasotocins an der renalen Salz- und vor allem Wasserausscheidung kann durch das gesamte Wirbeltierreich vergleichend physiologisch nachvollzogen werden [Pang *et al.*, 1982; Warne, 2002]. Fische, Amphibien und Reptilien sind aufgrund des Fehlens eines elaborierten renalen Gegenstromprinzipes inklusive der Henleschen Schleife nicht in der Lage, einen plasmahyper-tonen Endharn zu produzieren, so dass der mögliche Nachweis glomerulärer Wirkmechanismen bis *dato* im Vordergrund des wissenschaftlichen Interesses stand. So demonstrieren ältere Arbeiten bei Einsatz hoher Konzentrationen an AVT für einige Knochen- und Lungenfischarten vorrangig einen signifikanten Druckanstieg in der dorsalen Aorta mit darauf zurückzuführender renaler Diurese [Pang *et al.*, 1982; Sawyer *et al.*, 1982]. Die Etablierung einer *in situ* Präparation für die künstlich perfundierte Niere der Regenbogen-

forelle sowie des kleingefleckten Katzenhaies *Scyliorhinus canicula* erbrachte jedoch eindeutige Hinweise darauf, dass exogenes AVT in physiologisch sinnvoller Konzentration ( $10^{-10}$  -  $10^{-11}$  M/L) zu einer ausgeprägten Reduktion filtrierender Nephrone sowie Verminderung der Gesamt-GFR und freien Wasserclearance führte [Amer und Brown, 1995; Wells *et al.*, 2002]. Es bleibt zu klären, ob auch tubuläre Wirkmechanismen an der durch AVT-induzierten Antidiurese bei Fischen beteiligt sind [Warne, 2002]. Bei Amphibien stellen sowohl die Blutgefäße als auch die Organe mit Bedeutung für die Osmoregulation (Nieren, Blase und Haut) Zielstrukturen für AVT dar [Uchiyama, 1994; Acher, 1995]. Bei Amphibien agiert AVT an der Niere als antidiuretisches Hormon [Pang und Sawyer, 1978; Warburg, 1995], und induzierte sowohl bei Amphibien der Ordnung *Anura* (Froschlurche) als auch der Ordnung *Urodela* (Schwanzlurche) eine Antidiurese durch partielle Konstriktion der glomerulären Gefäße [Pang *et al.*, 1982; Cree, 1988; Boyd und Moore, 1990].

Die für Säugetiere und Vögel so eindeutig nachweisbare funktionale Beziehung zwischen der Osmolalität des Plasmas und der zirkulierenden AVT-Konzentration hat bei verschiedenen Reptilienarten zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt. Während Rice [1982] für *Varanus gouldii* eine lineare Abhängigkeit beider Parameter bestätigen konnte, erbrachten in vergleichbarer Weise durchgeführte Versuche bei der Schlange *Bothrops jararaca* keine positive Korrelation [Silveira *et al.*, 1998]. Die Bedeutung des Vasotocin-Systems für die antidiuretische Kontrolle der Reptilienniere geht vorrangig auf Arbeiten von Dantzer [1967, 1982] an verschiedenen Schlangenspezies wie der Wasserschlange *Natrix sipedon* zurück, wo der Autor erstmals an wachen Tieren die antidiuretische Wirkung des Hormones inklusive einer ausgeprägten Reduktion der GFR und der freien Wasserclearance bei unverändertem arteriellen Blutdruck nachweisen konnte. Die detaillierte Analyse des Einflusses exogener Salzbelastung oder Dehydratation auf Plasma-AVT sowie GFR, Urinflussrate und freie Wasserclearance an drei Agamenarten der Australischen Zentralwüste ergab eine Beteiligung glomerulärer aber auch tubulärer Mechanismen an der induzierten Antidiurese, bei klarer Beziehung zwischen Plasma-AVT und renaler Wasserelimination [Ford und Bradshaw, 2006]. An der Netzgame als einer verwandten Spezies konnte sowohl die AVT-bedingte Stimulation der Wasserreabsorption entlang des osmotischen Gradienten im Sammelrohrbereich als auch die Verdünnung der urinalen Flüssigkeit im Bereich des dünnen, intermediären Segmentes (IS) mit Homologie zur Henleschen Schlei-

fe [Hentschel und Elger, 1989] zwischen proximalen und distalen Nephroneneinheiten aufgezeigt werden [Bradshaw und Bradshaw, 2002]. Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass bei Fischen und Reptilien die glomeruläre Bedeutung als Zielstruktur für AVT nicht hoch genug eingeschätzt werden kann. Vögel könnten somit das Bindeglied zwischen der prinzipiell glomerulären Aktivität des AVT bei „niederen“ Wirbeltieren und der ausgeprägt tubulären Wirkung bei Säugetieren darstellen.

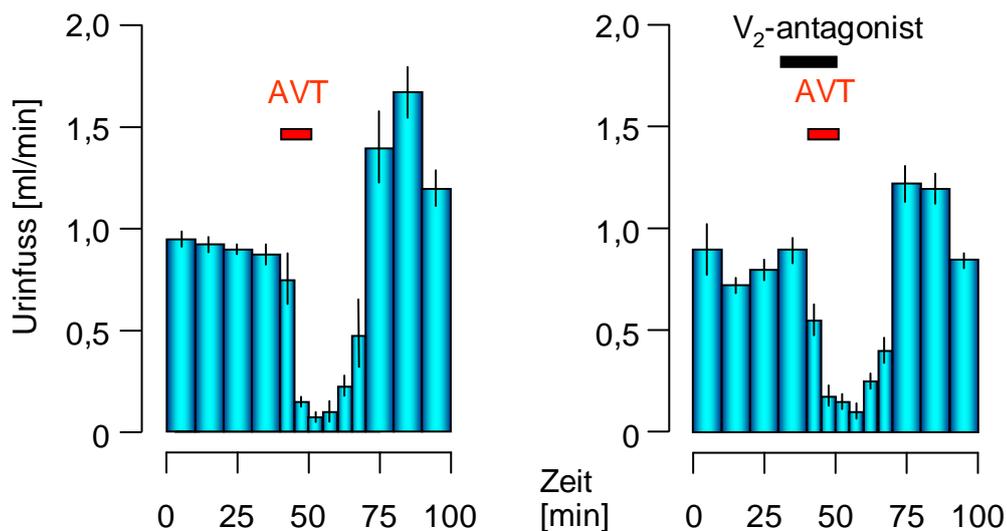
### 4.3. Das AVT-rezeptive System der Vogelniere

Bei Säugetieren vermittelt AVP sein Wirkungsspektrum über drei G-Protein gekoppelte, heptahelikale Transmembran-Rezeptoren vom  $V_{1a}$ -,  $V_{1b}$ - bzw.  $V_2$ -Subtyp, wobei alle drei im ZNS vorkommen [Burbach *et al.*, 1995; Birnbaumer, 2000]. In der Peripherie wird der  $V_{1a}$ -Subtyp in glatten Muskelzellen der Blutgefäße inklusive der renalen *Vasa recta* und einiger Sammelrohrzellen der Niere [Gerstberger und Fahrenholz, 1989; Terada *et al.*, 1993; Terada und Marumo, 1993; Bankir, 2001] sowie Hepatozyten der Leber exprimiert [Morel *et al.*, 1992], der  $V_{1b}$ -Subtyp ausschließlich in ACTH-produzierenden Zellen des Hypophysenvorderlappens [Sugimoto *et al.*, 1994] und der  $V_2$ -Subtyp im Sammelrohrbereich der Niere [Birnbaumer *et al.*, 1992; Lolait *et al.*, 1992].

AVT, das antidiuretische Hormon nahezu aller Vertebraten außer den Säugetieren, spielt bei Amphibien vor allem eine wichtige Rolle im Rahmen der Konstanthaltung der extrazellulären Körperflüssigkeit durch renale und kutane Wirkmechanismen. Der amphibische  $V_{1a}$ -Typ Vasotocin-Rezeptor weist dabei eine höhere Affinität für AVT als für AVP auf, während sich dies für den Säuger-spezifischen  $V_{1a}$ -Rezeptor genau gegenteilig verhält [Acharjee *et al.*, 2004]. Molekularbiologische Untersuchungen am Ochsenfrosch haben ergeben, dass die differentielle Liganden-Spezifität AVT- aber auch Mesotocin-spezifischer Rezeptorproteine bei „niederen“ Vertebraten wie Amphibien - im Vergleich zur Situation bei Säugetieren - vor allem im Bereich der Transmembranregionen VI und VII sowie der dazwischen befindlichen extrazellulären loop-3 Struktur begründet ist. Dabei scheinen drei Aminosäuren-Loci für die Ligandenselektivität von besonderer Bedeutung zu sein [Cho *et al.*, 2007; 2008].

Bis heute wurden mehr als 30 verschiedene Rezeptorproteine für neurohypophysäre Peptidhormone in zahlreichen Säugetiergattungen in ihrer Sequenz aufgeklärt, wobei das molekulare Wissen hinsichtlich dieser Proteine bei Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen immer noch limitiert ist. Bei Vögeln repräsentieren die Nieren, die Schilddrüse, der Hypophysenvorderlappen sowie einige spezialisierte Blutgefäße wie die *Vasa afferentia* der RT-Glomerula sowie das ZNS die wichtigsten Zielstrukturen des AVT [Baeyens und Cornett, 2006]. Als erster vogelspezifischer AVT-Rezeptor wurde der VT<sub>1</sub>-Rezeptor des Huhnes kloniert und seine Expression im ZNS sowie schwächer auch im Endometrium der Schilddrüse - nicht jedoch in Niere oder Leber - nachgewiesen [Tan *et al.*, 2000]. Kompetitive Bindungsstudien mit VT<sub>1</sub> - pcDNA3-Plasmid transfizierten COS7-Zellen, unter Benutzung von [<sup>3</sup>H]AVP als Radioligand, haben folgende Rangordnung für AVT-Analoga ergeben: AVT = AVP > Oxytocin > Mesotocin > Isotocin. *Second messenger* Assays, durchgeführt ebenfalls in transfizierten COS7-Zellen erbrachten Hinweise auf eine Aktivierung des IP<sub>3</sub> - Ca<sup>2+</sup>, nicht jedoch cAMP Signaltransduktionsweges durch AVT. Der ebenfalls durch zwei Exons, mit dazwischen liegendem Intron, kodierte VT<sub>2</sub>-Rezeptor wurde auch erstmals von Gewebe des Huhnes kloniert und mit hoher Expressionsrate in der Adenohypophyse nachgewiesen [Cornett *et al.*, 2003; Jurkevich *et al.*, 2005]. Dabei bildet der VT<sub>2</sub>-Rezeptor oft ein Heterodimer mit dem vogelspezifischen CRH-Rezeptor [Mikhailova *et al.*, 2007]. Weder RT-PCR noch Northern blotting haben Hinweise auf VT<sub>2</sub>-Expression in peripheren Geweben wie etwa der Niere erbracht. COS7-Zellen mit transfiziertem VT<sub>2</sub> Genkonstrukt antworteten auf AVTerge Stimulation mit einer Aktivierung des IP<sub>3</sub> - Ca<sup>2+</sup> Signaltransduktionsweges. Interessanterweise konnten die Autoren keinerlei spezifische Bindung für [<sup>3</sup>H]AVP an den in COS7-Zellen exprimierten Rezeptor erzielen. Die Rangordnung in der Fähigkeit, die intrazelluläre Bildung von IP<sub>3</sub> in COS7-Zellen anzuregen, ergab sich zu : AVT > AVP > Mesotocin > Oxytocin. Ein dritter, Oxytocin-ähnlicher Rezeptor konnte im Myometrium der Schilddrüse des Huhnes nachgewiesen werden (OT-like Rezeptor) [Gubrij *et al.*, 2005]; er wird auch als VT<sub>3</sub> Rezeptor bezeichnet [Srivastava *et al.*, 2007, 2010]. Die drei bis *dato* charakterisierten aviären Rezeptorproteine mit hochaffiner Bindung von [<sup>3</sup>H]AVP zeigen lediglich 45 - 50 % Sequenzhomologien untereinander [Baeyens und Cornett, 2006] und kommen sämtlich nicht in der Niere des Vogels vor.

Die unter Kap. 4.2. der Diskussion mannigfaltig beschriebene physiologische Aktivität des zirkulierenden AVT auf die Salz- und Wasserausscheidung der Vogelniere müsste also auf einen offensichtlich noch nicht identifizierten AVT-Rezeptorsubtyp, möglicher- und auch sinnvollerweise einen dem  $V_2$ -Rezeptor der Säugerniere verwandten Rezeptor zurückzuführen sein. Erstaunlicherweise jedoch konnte ein vogelspezifisches Analogon zum renalen  $V_2$ -Rezeptor der Säugetiere bis *dato* nicht eindeutig charakterisiert werden. Dabei zeigten tierphysiologische Untersuchungen an der Stockente, dass sowohl AVT als auch AVP dosisabhängig zu einer renalen Antidiurese und Antinatriurese führten, wobei vergleichbare Wirkungen für AVT schon in etwa 10-fach niedrigerer Dosierung erzielt werden konnten als für AVP [Gerstberger *et al.*, 1994; Gerstberger, 1997]. Als klassischer  $V_2$ -Rezeptoragonist bewirkte dDAVP erst in hohen Konzentrationen eine marginale Antidiurese ohne Beeinflussung der renalen Natriumausscheidung, und keiner der eingesetzten-



**Fig. 35 :**  $V_2$ -Rezeptor unabhängige, AVT-induzierte renale Antidiurese des Huhnes. Zur Induktion einer konstanten renalen Dauerdiurese erhielten junge Hähne (Alter 4 Monate) eine intravenöse Dauerinfusion einer 200 mOsm/kg NaCl-Lösung bei einer Infusionsrate von 1,0 ml/min. Durch systemische (i.v.) Infusion von AVT (0,5 ng/min/kg KG für 10 min) induzierte Antidiurese in Abwesenheit (links) bzw. Anwesenheit (rechts) eines Säuger- $V_2$ -Rezeptor spezifischen Antagonisten (100 ng/min/kg KG). Daten zeigen die Urinflussraten in Sammelproben über 5 bzw. 10 min; dargestellt sind Mittelwerte mit ihren Standardfehlern (S.E.M.) von n = 10 Versuchen. (Unveröffentlichte Daten von R. Gerstberger)

V<sub>1</sub>- bzw. V<sub>2</sub>-Rezeptor spezifischen Antagonisten vermochte selbst in 1000-fach höherer Konzentration die durch 0,5 ng/min/kg KG AVT (10 min) induzierte Antidiurese/Antinatriurese zu beeinflussen [Gerstberger *et al.*, 1994; Gerstberger, 1997]. Dies ließ sich auch für das Huhn in vorläufigen Experimenten bestätigen [Mütze *et al.*, 2008] (Abb. 35).

Kompetitive Verdrängungsstudien mit [<sup>3</sup>H]AVP als Radioliganden ergaben für eine angereicherte Plasmamembranfraktion aus Nierengewebe des Huhnes in der vorliegenden Arbeit eine Rangfolge der Bindungsaffinitäten von AVT ≥ AVP > [Phe<sup>2</sup>, Orn<sup>8</sup>]Oxytocin > Mesotocin > dDAVP. Die relativ hohe Affinität des AVT-rezeptiven Systems der Hühnerniere für den V<sub>1</sub>-Rezeptor spezifischen Agonisten [Phe<sup>2</sup>, Orn<sup>8</sup>]Oxytocin stimmt nur eingeschränkt mit den für die Niere der Stockente erhaltenen Daten überein (AVT = AVP > Oxytocin > Mesotocin > dDAVP > V<sub>1</sub>-Rezeptor spezifische Liganden) [Gerstberger *et al.*, 1994; Gerstberger, 1997]. Zu den für die Niere der Stockente vergleichbaren Daten gehören interessanterweise an Nierengewebe des Klauenfrosches *Xenopus laevis* sowie des Fuchskusus, einer australischen Opossum-Art, ermittelte Bindungsaffinitäten [Kloas und Hanke, 1992; Bathgate und Sernia, 1995]. Die offensichtlich ausgeprägtere Potenz V<sub>1</sub>-Rezeptor spezifischer Liganden für den renalen AVT-Rezeptor des Huhnes fand sich auch durch die Ergebnisse der autoradiographischen Studien bestätigt, in denen in erster Linie der Bereich der RT-Glomerula mit dem Radioliganden markiert werden konnte. Für die Nieren mehrerer Säugetier-Spezies wurde das Vorkommen funktioneller V<sub>1a</sub>-Rezeptoren im Bereich des glomerulären *Mesangium* sowie der dicken, aufsteigenden Henle-Schleife beschrieben [Jard *et al.*, 1987; Rose *et al.*, 1991]. Als für Huhn und Stockente vergleichbar erwies sich die niedrige Affinität V<sub>2</sub>-Rezeptor spezifischer Agonisten sowie Antagonisten mit K<sub>i</sub>-Werten drei oder mehr Zehnerpotenzen höher als diejenigen für AVT bzw. AVP [Gerstberger *et al.*, 1994; Gerstberger, 1997]. Rezeptorautoradiographische Studien in der vorliegenden Arbeit deuteten auch auf eine, wenngleich schwächer ausgeprägte, spezifische [<sup>3</sup>H]AVP Markierung im Bereich der medullären Sammelrohre der Hühnerniere hin, also den tubulären Strukturen mit markanter AQP-2 Expression. Bei der Markierung der Niere der Stockente mit tritiiertem AVP ergab sich ein differenzierteres Bild mit hoher Rezeptordichte für den Bereich der distalen Tubuli um die zentrale Vene eines Nierenläppchens sowie distinkte Bereiche der Markkegel [Gerstberger *et al.*, 1994, Gerstberger, 1997].

Die Hormon-induzierte Internalisation, Sequestrierung bzw. Down-Regulation des entsprechenden membranständigen Rezeptorproteins wurde von mehreren Arbeitsgruppen für den  $V_2$ -Rezeptor der Säugerniere dokumentiert [Steiner und Phillips, 1988], wobei AVP möglicherweise indirekt durch Aktivierung eines  $V_{1a}$ -Rezeptors in der luminalen Membran der Sammelrohr-Hauptzellen eine verminderte Expression oder Membranlokalisation des  $V_2$ -Rezeptors bewirkte [Terada *et al.*, 1993; Terada und Marumo, 1993; Bouley *et al.*, 2005; Izumi *et al.*, 2007]. Hinsichtlich der durch erhöhte Konzentrationen an zirkulierendem AVT induzierten Down-Regulation der AVT-spezifischen Rezeptordichte in der Hühnerniere in der vorliegenden Arbeit konnte auch bei Salzwasser-adaptierten bzw. Frischwasser-adaptierten aber dehydrierten Stockenten - im Vergleich zu euhydrierten Stockenten - eine Reduktion der  $B_{max}$  -Werte ermittelt werden [Gerstberger, 1997]. Limitierte Rezeptorbindungsstudien mit Plasmamembran-Fragmenten von Hühnernieren mit renalem DI ergaben ebenfalls eine Reduktion der AVT-Rezeptordichte auf weniger als 50 % der Kontrolltiere [McCracken *et al.*, 1994].

#### **4.4. Zyklisches AMP als *second messenger* für die renale Wirkung des AVT**

Molekularbiologische Analysen haben klar demonstriert, dass es sich bei dem rezeptiven System für AVT bei Vögeln und anderen „niederen“ Vertebratengruppen wie Amphibien oder Fischen um einen 7-transmembranalen, G-Protein gekoppelten Rezeptor handelt, sehr ähnlich den  $V_1$ - bzw.  $V_2$ -Rezeptorsubtypen der Säugetiere [Cho *et al.*, 2007, 2008]. So hatte beispielsweise die Bindung des Radioliganden [ $^3$ H]AVP an eine angereicherte Plasmamembranfraktion der Entenniere in Ab- bzw. Anwesenheit nicht-hydrolysierbarer GTP-Analoga wie etwa GTP $\gamma$ S oder GppNHp eine markante Reduktion der Ligandenbindung zur Folge, wodurch der experimentelle Nachweis für das Vorliegen eines G-Protein gekoppelten AVT-Rezeptors erbracht wurde [Gerstberger, 1997].

Das besondere Interesse galt daher der vergleichend-physiologischen Analyse der intrazellulären Signaltransduktion in den Epithelzellen spezifischer Nephronabschnitte nach Aktivierung des jeweiligen ADH-Rezeptors durch das entsprechende antidiuretische Hormon (AVP, AVT). So konnte schon in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts für die Niere des Säugers überzeugend aufgezeigt werden, dass AVP nach entsprechender Rezeptorbindung in den Hauptzellen der Sammelrohre bereits in subnanomolarer Konzentration

einen Anstieg der intrazellulären Produktion an zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) mit nachfolgender Erhöhung der Wasserpermeabilität des Sammelrohrepithels hervorrief [Grantham und Burg, 1966; Hebert und Andreoli, 1986]. EC<sub>50</sub>-Werte für diese AVP-induzierte cAMP Biosynthese in Sammelrohrgewebe aus der inneren Markzone der Rattenniere lagen in experimentellen Studien bei unter 1 nM/L [Yasuda und Jeffries, 1998]. Zyklisches AMP repräsentiert(e) seitdem den klassischen intrazellulären *second messenger* in den Hauptzellen des Sammelrohrbereichs der Säugerniere für die durch AVP induzierte renale Antidiurese [Birnbaumer, 2000; Hoffert *et al.*, 2005]. Vergleichend physiologische Untersuchungen an isolierten Nephronsegmenten der Regenbogenforelle (*Onchorhynchus mykiss*) erbrachten ebenfalls den Nachweis auf einen dosisabhängig AVT-vermittelten Anstieg der intrazellulären cAMP Konzentration [Perrot *et al.*, 1993], bei paralleler Inhibition der cAMP Bildung in Membranfraktionen des Kiemenepithels [Guibbolini und Lahlou, 1992]. Auch die Transfektion von CHO-Zellen mit dem V<sub>2</sub>-ähnlichen Rezeptorprotein eines afrikanischen Lungenfisches führte bei Stimulation mit AVT zu einer dosisabhängigen intrazellulären cAMP Bildung [Konno *et al.*, 2009]. Ebenso konnte die cAMP-Bildung durch AVT anhand von Sammelrohrpräparaten der Froschniere (*Rana ridibunda*) sowie im Bereich des intermediären Segmentes des Nephrons bei einer Eidechsenart (*Ctenophorus ornatus*) demonstriert werden [Ammar *et al.*, 1995; Bradshaw und Bradshaw, 1996].

Hinsichtlich der Bedeutung von cAMP als *second messenger* im Rahmen der AVT-induzierten renalen Antidiurese bei Vögeln liegt eine wesentlich komplexere, teils widersprüchliche Datenlage vor. So wurde schon vor 37 Jahren von der Wirkungslosigkeit des Peptidhormones AVT in Bezug auf eine gesteigerte Synthese von cAMP in Nierengewebe des Huhnes und der Taube berichtet [Dousa, 1974]. Nachfolgende Studien an isoliertem Nierengewebe von Wachteln haben ebenfalls keine überzeugend positiven Ergebnisse erbracht. So zeigten isoliert präparierte, medulläre MKs der Haubenwachtel (*Colinus virginianus*), inkubiert mit 10<sup>-6</sup> M/L AVT in Abwesen- bzw. Anwesenheit von Phosphodiesteraseinhibitoren, keine eindeutige Ansprechbarkeit des medullären Adenylatzyklase-Systems auf Neuropeptide wie AVT, jedoch auf die Applikation von Forskolin [Goldstein, 1995]. Bei Forskolin handelt es sich um ein pflanzliches Diterpen mit direkter, aktivierender Wirkung auf die membranständigen Adenylatzyklasen [Hedin und Rosberg,

1983; Daly, 1984; van Belle, 1985]. Nishimura und Mitarbeiter [1996] untersuchten an isoliert-perfundierten, medullären Sammelrohren der Nieren japanischer Wachteln (*Coturnix coturnix*) deren osmotisch und/oder diffusive Wasserpermeabilität ( $P_{wd}$ ), welche durch die Applikation von Forskolin [ $10^{-5}$  M/L], nicht aber dessen inaktivem Analogon 1,9-dideoxy-Forskolin, um das 20-fache gesteigert werden konnte. AVT hatte selbst in der bei weitem supraphysiologischen Konzentration von  $10^{-5}$  M/L lediglich einen marginalen Einfluss auf die osmotische Diffusibilität. Der Effekt des AVT ( $10^{-6}$  bzw.  $10^{-5}$  M/L) auf die Wasserpermeabilität in Wachteln zeigte sich als geringfügiger als derjenige des AVP [ $10^{-9}$  M/L] für die Ratte [Kondo und Imai, 1987] bzw. das Kaninchen [Hebert und Andreoli, 1986]. In derselben Studie bewirkte AVT in der genannten Konzentration, bei niedriger Basalkonzentration an intrazellulärem cAMP in corticalen Segmenten medullärer Sammelrohre, eine Erhöhung des zellulären cAMP-Spiegels um den Faktor 6, während medulläre Segmente der Sammelrohre bei wesentlich höheren Basalwerten lediglich eine 2-fache Steigerung zeigten. Forskolin hingegen bedingte eine 100- respective 40-fache Erhöhung der Basalwerte. Während in einer angereicherten Plasmamembranfraktion der Entenniere der intrazelluläre cAMP Gehalt durch Inkubation mit Forskolin ( $5 \times 10^{-6}$  M/L) um das etwa 25-fache gesteigert werden konnte - aktivierbare Adenylatzyklase also vorhanden war -, konnte durch Inkubation mit AVT in steigenden Konzentrationen ( $10^{-12}$  -  $10^{-6}$  M/L) keine Stimulation des basalen cAMP Signals induziert werden [Gerstberger, 1997]. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnten Stallone und Mitarbeiter [1994] durch Anwendung eines Assay-Systems *in vitro* zumindest für die aus Nieren von Legehybriden isolierten mMKS zeigen, dass AVT in der hohen Dosis von  $10^{-7}$  M/L zu einem zwar statistisch signifikanten Anstieg der intrazellulären cAMP-Produktion führte, jedoch auf lediglich 150 % der basalen Werte. Schließlich wurde in detaillierten Untersuchungen an aus medullären Markkegeln der Niere des Hausspatzes (*Passer domesticus*) präparierten Nephronsegmenten nachgewiesen, dass die Aktivierung der Adenylatzyklase durch Forskolin eine 10-fache Stimulation der cAMP Bildung für den dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife sowie eine etwa 14-fache Stimulation für medulläre Sammelrohrsegmente zur Folge hatte. In supraphysiologischen Konzentrationen von  $10^{-7}$  -  $10^{-6}$  M/L, nicht jedoch  $10^{-9}$  M/L vermochte AVT in den Sammelrohren die cAMP Biosynthese um den Faktor 4 - 5 zu steigern [Goldstein *et al.*, 1999]. Die in der vorliegenden Arbeit erzielten immunhistochemischen Ergebnisse zur möglichen, AVT-induzierten intrazellulären Synthese von

cAMP in AQP-2 immunreaktiven Hauptzellen im Bereich des *Cortex renalis* sowie des corticalen und medullären Markkegels eines jeden *Lobulus renalis* tragen ebenfalls nicht zu einer Unterstützung der Arbeitshypothese bei, dass auch bei Vögeln die renale Wirkung des antidiuretischen Hormons in erster Linie cAMP-vermittelt ist. So erwies es sich als schwierig, die schwache, cAMP spezifische Immunreaktion von der moderaten Autofluoreszenz der Sammelrohrzellen abzugrenzen. Eine ausgeprägte Markierung zahlreicher cAMP immunpositiver Epithelzellen konnte dagegen für den Bereich der distalen Tubuli sowie für einzelne Mesangialzellen der Glomerula demonstriert werden, wobei auch in diesem Fall eine eindeutige Induktion des *second messenger* cAMP durch erhöhte Plasmakonzentrationen an AVT nicht nachgewiesen werden konnte. Die offensichtliche Schwierigkeit in der Detektion endogener, AVT-induzierter *de novo* Synthese von cAMP in medullären Gewebeschnitten der Vogelniere könnte zumindest teilweise auf eine reduzierte Zugänglichkeit der entsprechenden Rezeptorproteine für AVT durch Internalisationsphänomene bzw. deren Funktionalitätsverlust zurückzuführen sein [Goldstein und Braun, 1989].

Pilotstudien an angereicherten Plasmamembranpräparationen der Entenniere ergaben außer dem negativen Resultat hinsichtlich einer möglichen cAMP Produktion eine dosisabhängige, AVT-induzierte Bildung von Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>) [Gerstberger, 1997]. Inositoltrisphosphat repräsentiert den klassischerweise beschriebenen *second messenger* für die Aktivierung z.B. der säugerspezifischen V<sub>1a</sub>- und V<sub>1b</sub>-Rezeptorsubtypen und führt meist nachgeschaltet über IP<sub>3</sub>-Rezeptoraktivierung zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration aus endogenen Speichern [Thibonnier *et al.*, 1998]. Dies wurde auch für die Signalkaskade des exklusiv im Hypophysenvorderlappen des Huhnes nachgewiesenen VT<sub>2</sub>-Rezeptors sowie des im ZNS und der Schilddrüse exprimierten VT<sub>1</sub>-Rezeptors beschrieben. So konnte nach Transfektion der entsprechenden mRNAs in COS7 Zellen eine dosisabhängige Aktivierung des Phosphatidyl „turn-overs“ sowie der intrazellulären Calciumfreisetzung bestimmt werden [Tan *et al.*, 2000; Cornett *et al.*, 2003]. In isolierten Sammelrohren der Rattenniere führte AVP zu einer vermehrten tubulären Wasser- und Harnstoffpermeabilität, sowie sowohl zu einer gesteigerten Synthese von cAMP als auch Generierung intrazellulärer Calciumsignale, wobei die Schwellenkonzentrationen an AVP bei 10 pM/L (Permeabilität; cAMP) bzw. > 100 pM/L (Calciumsignale)

lagen [Star *et al.*, 1988]. In Primärkulturen von Sammelrohrzellen der inneren Markzone der Rattenniere konnte andererseits aufgezeigt werden, dass AVP in Konzentrationen von  $> 10^{-10}$  M/L die Bildung von cAMP anzuregen vermochte, jedoch schon in Konzentrationen von  $10^{-16}$  M/L zu einer Aktivierung der Phospholipase C mit nachfolgender Synthese von IP<sub>3</sub> führte [Teidelbaum und Strasheim, 1990]. Schließlich konnten experimentelle Studien an der Rattenniere demonstrieren, dass es in Gegenwart von AVP manchmal zu einer Inhibition statt Stimulation der tubulären Wasserpermeabilität im Bereich des Sammelrohres kommen kann, möglicherweise vermittelt durch eine intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Mobilisation bzw. einen gesteigerten Einstrom von extrazellulärem Calcium in die Hauptzellen [Elalouf *et al.*, 1984; Han *et al.*, 1993]. Die intrazellulären Calciumsignale könnten dabei Proteinkinase A (PKA) -unabhängig durch erhöhtes cAMP vermittelt worden sein, wären also einer V<sub>2</sub>-Rezeptor Aktivierung eindeutig nachgeschaltet [Balasubramanian *et al.*, 2008]. Zur Klärung dieser Frage liegen bis *dato* widersprüchliche Daten vor. So bedingte einerseits die exogene Applikation membrangängiger cAMP-Analoga wie 8-Bromo-cAMP eine Zunahme der Tubuluspermeabilität, induzierte jedoch keine intrazellulären Calciumsignale [Star *et al.*, 1988]. Andererseits gibt es Hinweise dafür, dass subnanomolare AVP-Konzentrationen sehr wohl dazu in der Lage wären, intrazelluläre Calciumsignale im Bereich der Sammelrohrethelien zu generieren, und dass dieser Effekt durch den klassischen V<sub>2</sub>-Rezeptor Agonisten dDAVP sowie CPT-cAMP als membrangängigem cAMP-Analagon imitiert werden konnten [Ecelbarger *et al.*, 1996; Chou *et al.*, 2000; Yip, 2002]. Eine wesentliche Funktion in der diskutierten cAMP-IP<sub>3</sub>-Calcium Signalkaskade scheint dabei dem cAMP-Sensorprotein EPAC zuzukommen [Holz *et al.*, 2006].

#### **4.5. Charakteristika, Lokalisation und Regulation des renalen AQP-2 Wasserkanals im Vergleich zwischen Säugern und Vögeln**

In der Säugetierniere wurde bis *dato* die Expression acht unterschiedlicher Aquaporine (AQP-1 - AQP-4, AQP-6 - AQP-8, AQP-10) beschrieben. Dabei scheinen AQP-1 - AQP-4 eine bedeutsame Rolle im Rahmen der extrazellulären Flüssigkeitshomöostase auf der Ebene verschiedener Segmente des Nephrons zu spielen. AQP-1 findet sich sowohl auf der basolateralen als auch apikalen Seite vorwiegend proximaler Tubuli sowie der dünnen, absteigenden Strukturkomponente der Henle'schen Schleife. Während AQP-3 und AQP-4 vor allem in der basolateralen Membran epitheloider Zellen der Sammelrohre exprimiert

werden, wurde AQP-2 zumeist vesikulär in deren Zytosol bzw. deren apikalen Membran lokalisiert [Verkman, 2005; Takei *et al.*, 2007]. Für die Säugerniere konnte dabei eindeutig nachgewiesen werden, dass das V<sub>2</sub>-Rezeptorprotein für AVP sowie AQP-2 zu 100 % in Hauptzellen der medullären Sammelrohre co-lokalisiert sind [Fenton *et al.*, 2007]. Dabei fand sich das Rezeptorprotein zytoplasmatisch sowie assoziiert mit der basolateralen Membran, der Wasserkanal AQP-2 vesikelassoziiert sowie in Bereichen der apikalen/sub-apikalen Membranregion der Verbindungstubuli sowie der corticalen und medullären Sammelrohre. Interkalierende Schaltzellen exprimierten weder V<sub>2</sub>-R noch AQP-2 [Fushimi *et al.*, 1993; Yamamoto und Sasaki, 1998].

Die herausragende Funktion des AQP-2 für die AVP-kontrollierte Regulation der renalen Wasserausscheidung [King *et al.*, 2004; Knepper, 1997; Yamamoto und Sasaki, 1998; Nejsum, 2005] wurde in Versuchsansätzen deutlich, in welchen die extrazelluläre Dehydratation etwa durch Trinkwasserentzug bei der Ratte eine Erhöhung der AQP-2 Expression vor allem in der inneren Markzone der Niere zur Folge hatte [Michimata *et al.*, 2000; Schrier, 2006; Baggaley *et al.*, 2010]. Die *in vivo* Applikation des antidiuretischen Hormons AVP bzw. des V<sub>2</sub>-Rezeptor Agonisten dDAVP stimulierte die renale AQP-2 mRNA Expression und nachfolgende Biosynthese sowohl bei neonatalen Ratten als auch adulten Tieren mit intaktem (Long-Evans Stamm) bzw. AVP-defizientem (Brattleboro-Stamm) hypothalamischen AVP-System [Nielsen *et al.*, 1993a; 1995a; DiGiovanni *et al.*, 1994; Sabolic *et al.*, 1995; Yamamoto *et al.*, 1995]. Der *de novo* Synthese von AQP-2 Proteinen, basierend auf einer AVP-induzierten Transkription [Knepper, 1997] lag dabei die Funktion von pCREB (phosphoryliertes „cAMP-responsive element binding“ Protein) als Transkriptionsfaktor zugrunde [Nielsen *et al.*, 1993a; Matsumura *et al.*, 1997]. Ein hyperosmotischer Stimulus induzierte darüber hinaus die Genexpression für AQP-1 und AQP-3 [Ishibashi *et al.*, 1997b; Jeng *et al.*, 1998a, b; Umenishi und Schrier, 2003].

Die detaillierte Strukturanalyse des säugerspezifischen AQP-2 offenbarte eine Quartärstruktur als Homotetramer, in welchem jedes Monomer sechs membrandurchgängige, alpha-helikale Domänen mit zytoplasmischem Amino- und Carboxyterminus aufweist [Mitra, 2001]. Die hydrophilen Schleifen B (zwischen Domänen II und III) sowie E (zwischen Domänen V und VI) sind mit ihren hoch-konservierten NPA-Motiven (Asp-Pro-Ala) an

der Bildung der funktionellen Wasserpore beteiligt [Jung *et al.*, 1994a], die einen bidirektionalen, osmotisch getriebenen transmembranären Wasserfluss ermöglicht [Gonen und Walz, 2006]. Mutationen der Porenregion bzw. der Einsatz quaternärer Ammoniumverbindungen bedingten eine Reduktion der Wasserpermeabilität [Jung *et al.*, 1994b; Detmers *et al.*, 2006]. Western blot Analysen zeigten dabei in allen Studien die AQP-2 immunspezifische Markierung zweier Banden mit Molekulargewichten von 29 kDa bzw. 35 - 45 kDa, entsprechend der deglycosylierten bzw. glycosylierten Form eines AQP-2 Monomers. In den meisten Studien kamen dabei polyclonale anti-rAQP-2 Antikörper zum Einsatz, welche gegen das intrazelluläre, carboxyterminale Ende des Monomers gerichtet waren [DiGiovanni *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 1997; Møller *et al.*, 2009].

Auch aus Nierengewebe einiger Vogelspezies, wie dem Huhn, der Japanischen Wachtel oder dem Hausspatz, wurden kürzlich - vergleichbar zur Situation beim Säuger - ganz oder partiell die kodierenden Basensequenzen für die Aquaporine AQP-1 bis AQP-4 sowie AQP-7 und AQP-9 ermittelt [Yang *et al.*, 2004, 2007; Saito *et al.*, 2005; Casotti *et al.*, 2007; Nishimura *et al.*, 2007; Suigura *et al.*, 2008; Yoshimura *et al.*, 2011]. In der Niere des Hausspatzes konnten Casotti *et al.* [2007] die primäre Lokalisation von AQP-1 in proximalen und distalen Tubuli, sowie einigen Podozyten der Glomerula aufzeigen. In der Wachtelniere ließ sich AQP-1 spezifische mRNA sowohl in corticalen als auch medullären Bereichen nur geringfügig nachweisen, bei erfolgreicher immunhistochemischer Lokalisation in der Bürstensaummembran proximal tubulärer Epithelzellen [Yang und Nishimura, 2007; Nishimura, 2008]. Wachtelspezifisches AQP-1 demonstrierte im *Xenopus*-Oozyten Expressionssystem eine hohe Wasserpermeabilität und erwies sich dabei als Quecksilber-sensitiv [Yang und Nishimura, 2007]. Desweiteren isolierten Powers und Mitarbeiter [2002] die Teilsequenz eines AQP-1 homologen Wasserkanals aus der Niere des Kolibris mit 83 % Sequenzübereinstimmung zu bovinem AQP-1. Messenger RNA spezifisch für AQP-4 konnte sowohl für die Gesamtniere des Huhnes [Yoshimura *et al.*, 2011] als auch vor allem medulläre Areale der Wachtelniere mittels real-time PCR demonstriert werden [Yang *et al.*, 2007], allerdings ohne genauere nephronale bzw. zelluläre Lokalisation.

Erste Hinweise auf ein der Säugerniere ähnliches Expressionsmuster für AQP-2 sowie eine vergleichbare physiologische Rolle erbrachten die Arbeiten an der Japanischen Wachtel

[Nishimura, 2008]. Den Darstellungen der AQP-2 Expression beim Säuger, vor allem aber der Wachtel ähnlich [Yang *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2007; Lau *et al.*, 2009], konnte in der vorliegenden Arbeit eine markante AQP-2 Expression in nahezu allen Hauptzellen der corticalen bzw. medullären Sammelrohre nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu Untersuchungen auf mRNA Niveau aber auch Proteinebene an der Wachtelniere mit signifikant schwächerer AQP-2 Expression in corticalen *versus* medullären Nierenbereichen bzw. Sammelrohren [Yang *et al.*, 2004; Lau *et al.*, 2009] konnte immunhistochemisch auf Proteinebene jedoch kein Unterschied in der Expressionsstärke für die cSRs in *Cortex renalis* bzw. cMK verglichen zu derjenigen für die mSRs im mMK der Hühnerniere festgestellt werden. Die immunhistochemische Co-Markierung der vogelspezifischen Carboanhydrase II (CA-II) [Gabielli *et al.*, 1998] ermöglichte darüber hinaus die eindeutige Differenzierung AQP-2 exprimierender Hauptzellen und CA-II positiver, AQP-2 defizienter Schaltzellen in allen Bereichen des *Cortex renalis* sowie des Markkegels der Hühnerniere. Vergleichbare immunhistochemische Studien an der Rattenniere demonstrierten ebenfalls, dass V-ATPase exprimierende Schaltzellen nicht den Wasserkanal AQP-2 enthielten [Brown *et al.*, 2009]. Wie für *Coturnix coturnix* beschrieben [Yang *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2007], ließen sich auch für die Hühnerniere nur sehr vereinzelt AQP-2 immunreaktive Epithelzellen im Bereich der dicken, aufsteigenden Henle-Schleife, und gar nicht für den proximalen Tubulus darstellen. Das für die immunhistochemischen Untersuchungen eingesetzte, polyclonale rabbit anti-rat AQP-2 Antiserum war, wie schon für die oben beschriebenen, zum Nachweis des AQP-2 in der Säugerniere eingesetzten Antikörper, gegen das C-terminale Ende des ratten-spezifischen AQP-2 gerichtet. Desgleichen zeichnete sich der für die immunhistochemische und gelelektrophoretische Charakterisierung von AQP-2 in der Wachtelniere herangezogene Antikörper als C-Terminus spezifisch aus [Fushimi *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2007]. Die dem C-terminalen „loop“ des rattenspezifischen AQP-2 entsprechende, und für die Antikörper-Produktion herangezogene Aminosäuresequenz 254 - 271 jedoch ist für chAQP-2 bis *dato* nicht bekannt. Aufgrund der selektiven Markierung von Hauptzellen der Sammelrohre wird dennoch von einer chAQP-2 spezifischen immunhistochemischen Markierung in der vorliegenden Arbeit ausgegangen.

Auch für die Vögel wird die besondere Bedeutung des AQP-2 für die renale Funktion im Rahmen der EZF-Homöostase aus mehreren experimentellen Studien deutlich. Der 24-stündige Entzug des Trinkwassers - in etwa vergleichbar der 40-stündigen Dehydratationsperiode in der vorliegenden Arbeit - führte so bei sieben Tage alten Hühnerküken zu einer signifikanten Zunahme sowohl der AQP-2 als auch AQP-3 Expression für die Gesamtniere dieser Tiere [Sugiura *et al.*, 2008]. Dehydratation bewirkte andererseits eine Down-Regulation des renalen AQP-4 Wasserkanals auf mRNA Ebene in der Niere des Huhnes [Saito *et al.*, 2005]. Die systemische Applikation einer stark hyperosmotischen NaCl-Lösung bei 18 Tage alten Hähnchen hatte zeitabhängig eine Stimulation der AQP-1 und AQP-2 Expression mit erhöhten mRNA-Konzentrationen zur Folge [Sugiura *et al.*, 2008]. Die Dehydrierung japanischer Wachteln für 48 - 72 Stunden verursachte bezüglich des mittels real-time PCR analysierten AQP-2 spezifischen mRNA-Gehaltes der corticalen, vor allem jedoch medullären Komponente renaler Markkegel eine signifikant gesteigerte Expression, die sich zudem auf Proteinebene verifizieren ließ [Yang *et al.*, 2004; Lau *et al.*, 2009]. Die Transfektion von Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* mit einem die Basensequenz für wachtelspezifisches AQP-2 (qAQP-2) enthaltenden Genkonstrukt verursachte in hypotonem Medium eine 20-fach höhere osmotische Wasserpermeabilität als bei nicht transfizierten Oozyten, equivalent zur hervorgerufenen Wasserpermeabilität nach Transfektion mit mRNA für humanes AQP-1. Die markante Inhibition des qAQP-2 bedingten Wasser-einstroms in Gegenwart von HgCl<sub>2</sub> stimmt mit der Existenz Quecksilber-sensitiver Positionen (Cys<sup>182</sup>) an equivalenten Lokalisationen zum rattenspezifischen AQP-2 überein [Fushimi *et al.*, 1993; Bai *et al.*, 1996]. Andererseits hatte die Expression qAQP-4 spezifischer mRNA bzw. cDNA in *Xenopus*-Oozyten keine signifikante Wasserverschiebung zwischen Extrazellularraum und Zellinnerem zur Folge [Nishimura und Fan, 2002].

Für die Klasse *Aves* wurde bis *dato* die Aminosäuresequenz für das AQP-2 der Wachtel, teilweise auch des Huhnes, aufgeklärt. Der Einsatz spezifischer Primer-Paare ermöglichte es, nach Gesamt-RNA Isolierung aus Nierengewebe weißer Legehühner die Basensequenz 1 - 517 der Hühner-spezifischen AQP-2 (chAQP-2) mRNA und folglich die zugehörige Aminosäuresequenz 1 - 172 des chAQP-2 zu ermitteln [Sugiura *et al.*, 2008]. Die somit erst partiell zu etwa 2/3 clonierte AQP-2 cDNA des Huhnes zeigte in den bis *dato* bekannten Bereichen eine 98 % Sequenzhomologie zum qAQP-2 der Wachtel, sowie eine 79 %

bzw. 80 % Homologie zum AQP-2 der Ratte bzw. des Menschen [Suigura *et al.*, 2008]. Für qAQP-2 wiederum errechnete sich bei prinzipiell identischer Grundstruktur zum säugerspezifischen AQP-2 eine 75 % Sequenzhomologie zum AQP-2 der Ratte [Yang *et al.*, 2004; Lau *et al.*, 2009]. Während Ramirez-Lorca und Mitarbeiter [2006] für chAQP-2 das Vorkommen eines NPV-Motivs anstelle des ersten NPA-Motivs postulierten, beschrieben Sugiura und Mitarbeiter [2008], dass die chAQP-2 Sequenz doch zwei NPA-Motive wie im Falle des säugerspezifischen Proteins aufweist. Wachtelspezifisches qAQP-2 zeichnet sich weiterhin durch eine N-Glycosylierungsstelle (Asp<sup>124</sup>) sowie eine Phosphorylierungsstelle für die cAMP-abhängige Proteinkinase am zytoplasmatischen Carboxyterminus (Ser<sup>256</sup>) aus, äquivalent zum AQP-2 der Ratte [Yang *et al.*, 2004; Fushimi *et al.*, 1997]. Western blot Analysen für die Wachtelniere resultierten in der Detektion zweier Proteinbanden mit Molekulargewichten von 29 kDa respektive 38 kDa, die - wie für säugerspezifisches AQP-2 dargestellt - mutmaßlich die deglycosylierte bzw. glycosylierte Form eines qAQP-2 Monomers repräsentierten [Yang *et al.*, 2004]. Proteinbiochemische Versuchsansätze für den Nachweis des AQP-1 Wasserkanals in der Chorioallantoismembran des Hühnerembryos [Ribatti *et al.*, 2002] bzw. der Lunge und kapillären Endothelzellen der hypertrophierten, supraorbitalen Salzdrüse der Stockente [Müller *et al.*, 2006] erbrachten vergleichbare Ergebnisse.

#### **4.6. Die Translokation des AQP-2 Wasserkanals in die apikale bzw. laterale Plasmamembran der Sammelrohrzellen**

Bis *dato* sind 13 verschiedene Aquaporine für Säugetiere und mindestens sieben für Vögel identifiziert worden [Takata *et al.*, 2008; Isokpehi *et al.*, 2009]. Dabei repräsentiert AQP-2 in beiden Tierklassen den bis *dato* einzigen Subtyp, dessen Expression und vor allem zelluläre Translokation unter hormonaler, AVPerger bzw. AVTerger Kontrolle steht [Noda und Sasaki, 2005; Takata *et al.*, 2008; Nishimura, 2008]. Auch bei Amphibien, namentlich den Froschlurchen konnten 17 verschiedene AQP mRNAs charakterisiert werden, wobei für *Hyla japonica* drei Aquaporine mit ebenfalls AVTerger Kontrolle cloniert werden konnten [Hasegawa *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2007; Onishi *et al.*, 2010]. Aus historischer Sicht spielen gerade Amphibien eine herausragende Rolle in der Entdeckungsgeschichte der Aquaporine, für deren Charakterisierung 2003 der Nobelpreis vergeben wurde [Agre, 2005; 2009]. So wurde schon lange vor der Sequenzierung des ersten Aquaporin-Proteins

an der Harnblase der Kröte die „shuttle Hypothese“ entwickelt, basierend auf der Visualisierung „partikelähnlicher Aggregate“, welche in die apikale Membran der Blasenepithelzellen internalisiert und wieder „rückgeschleust“ werden konnten, in Abhängigkeit vom Grad der Wasserreabsorption [Wade *et al.*, 1981; Wade, 1989].

Grundvoraussetzung für eine Translokation des AQP-2 aus dem Zytosol in die zumeist apikale und/oder laterale Plasmamembran medullärer Hauptzellen der Säugerniere stellt eine Aktivierung des hypothalamo-neurohypophysären AVP-Systems dar [Baylis, 1987; Robertson, 1987]. Durch die Aktivierung intrazellulärer Signalwege findet schließlich die Translokation vesikulär gespeicherter AQP-2 Proteine in die apikale, teils auch (baso-) laterale Plasmamembran statt. An diesem Translokationsprozess des AQP-2 sind zudem zahlreiche intrazelluläre Strukturproteine wie Komponenten des Zytoskeletts, des SNARE-Komplexes oder AQP-2 spezifische Bindungsproteine beteiligt [Boone und Deen, 2008].

Auch bei den amphibischen Aquaporinen AQP-h2 und AQP-h3 von *Hyla japonica* [Tanii *et al.*, 2002; Hasegawa *et al.*, 2003] handelt es sich, ähnlich wie bei AQP-2 der Vögel und Säuger, um ADH-regulierte Wasserkanäle. Beide Aquaporine finden sich co-lokalisiert in den granulären Zellen unterhalb der keratinisierten Schicht im „pelvis patch“ der Haut exprimiert, AQP-h2 darüber hinaus in granulären Zellen der Harnblase [Tanii *et al.*, 2002; Hasegawa *et al.*, 2003]. AVT-vermittelt wurde, vergleichbar der Situation in der Säugerniere, eine Translokation des Wasserkanals vom zytoplasmatischen Pool zur apikalen Plasmamembran der granulären Zellen aufgezeigt. So konnte 15 - 20 min nach AVT-erger Stimulation von Froschhautpräparaten *in vitro* eine eindeutige Immunreaktion für AQP-h2 sowie AQP-h3 im apikalen Segment der granulären Zellen demonstriert werden. Dabei kam es im Bereich der Harnblase auch zur Bildung vesikulärer Strukturen nahe der apikalen Plasmamembran der Epithelzellen [Hasegawa *et al.*, 2003]. Durch Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen den phosphorylierten C-Terminus des AQP-h2 konnte schon zwei min nach Inkubation mit AVT maximal phosphoryliertes AQP-h2 intrazellulär nachgewiesen werden, verbunden mit der apikalen Formation von „Aggregaten“, vergleichbar den elektronenmikroskopischen Gefrierbruchdarstellungen [Chevalier *et al.*, 1974; Kachadorian *et al.*, 1990; Hasegawa *et al.*, 2005]. Die messtechnische Erfassung der Wasserpermabilität in *Xenopus*-Oozyten nach Transfektion mit amphibienspezifischer

AQP-h2 bzw. AQP-h3 mRNA zeigte eine signifikante Steigerung des Wasserflusses nach Einbau der Wasserkanäle in die Oozytenmembran sowie zusätzlicher Stimulation mit cAMP [Kachadorian *et al.*, 1987; Valenti *et al.*, 2005].

Vergleichbar zur Situation der Säugerniere bzw. der Amphibienblase oder -haut lagen hinsichtlich der AVT-induzierten AQP-2 Translokation für die Vogelniere vor Einreichung der vorliegenden Arbeit lediglich Daten für die Wachtelniere vor [Yang *et al.*, 2004; Nishimura, 2008]. Beide Studien bedienten sich eines immunhistochemischen Analyseverfahrens, durchgeführt an Nierenschnitten euhydrierter Kontrolltiere sowie von Tieren, die entweder einer extrazellulären Dehydratation (40 Std. beim Huhn, 48 Std. bei der Wachtel) oder einer exogenen AVT-Applikation (akute 5 ng/min/kg KG AVT-Infusion für 30 min beim Huhn; repetitive s.c. Injektionen von 50 ng/kg KG AVT bei der Wachtel) unterzogen worden waren. In der vorliegenden Arbeit kam ein polyclonaler Antikörper gegen rAQP-2 zum Einsatz. An der Hühnerniere wurden AQP-2 exprimierende Hauptzellen im Bereich der Sammelrohre unter den drei genannten Versuchsbedingungen in sieben unterschiedliche Zellkategorien (A - G) eingeteilt, welche sich hinsichtlich der Lokalisation des AQP-2 Proteins sowie dessen jeweiliger Expressionsstärke unterschieden (Kap. 2.2.2.4.6). Anhand der ebenfalls mit Hilfe eines polyclonalen anti-rAQP-2 Antikörpers immunmarkierten Nierengewebsschnitte der Wachtel erfolgte eine Einteilung der jeweiligen AQP-2 positiven Epithelzellen für den proximalen Tubulus, den dicken aufsteigenden Schenkel der Henle-Schleife sowie corticale und medulläre Sammelrohre nach einem 5-Stufen Schema [Yang *et al.*, 2004].

- [1] keine spezifische AQP-2 Immunmarkierung der Zellen
- [2] Diffus-schwache AQP-2 Immunmarkierung im apikalen Bereich einiger Zellen
- [3] Apikal-zytosolische sowie -membranassoziierte AQP-2 Immunmarkierung in 1/3 der Zellen
- [4] Apikal-zytosolische sowie -membranassoziierte AQP-2 Immunmarkierung in 2/3 der Zellen
- [5] Starke AQP-2 Immunmarkierung nahe/in der apikalen Membran in allen Zellen

Daraus wurde für jedes der vier nephronalen Segmente aller drei Tiergruppen eine dieser Einteilung entsprechende mittlere Punktzahl für eine Kohorte mehrerer Hauptzellen errechnet [Yang *et al.*, 2004].

Für das Huhn konnte sowohl nach Dehydratation als auch systemischer AVT-Infusion in allen drei analysierten Nierenregionen (Cortex, cMK, mMK) eine deutliche Translokation des immunreaktiven AQP-2 dargestellt werden. So erfolgte aufgrund des 40-stündigen Trinkwasserentzuges eine Translokation vorwiegend in die apikale, teilweise aber auch laterale Zellmembran, bei stärkster Ausprägung in den Sammelrohrsegmenten des *Cortex renalis* und nicht des medullären Markkegels. Die akute, systemische AVT-Applikation hingegen verursachte eine AQP-2 Translokation nur teilweise in die apikale, vorrangig jedoch in die laterale Plasmamembran, ebenfalls mit starker Beteiligung corticaler Sammelrohre. Im Gegensatz dazu ergab sich für den Bereich der medullären Sammelrohre der Wachtelniere schon für die euhydrierten Kontrolltiere eine gemittelte Punktzahl von 2,99, gleichbedeutend mit AQP-2 immunreaktiver Markierung in etwa 30 % der vorhandenen Epithelzellen (= Hauptzellen). Dehydrierung respektive die systemische AVT-Applikation bedingten eine signifikante Zunahme auf 4,20 respektive 3,84 [Yang *et al.*, 2004]. Die nach repetitiver AVT-Injektion schwächer ausgeprägte Translokation des AQP-2 Wasserkanals im Vergleich zu der bei dehydrierten Wachteln beobachteten könnte in Analogie zur vorliegenden Studie an der Hühnerniere auf eine partielle Translokation in die laterale und nicht apikale Zellmembran zurückzuführen sein [Mütze *et al.*, 2008]. Im Unterschied zu den für das Huhn erzielten Ergebnissen zeigten die Hauptzellen der corticalen Sammelrohre eine für alle drei Tiergruppen vergleichbare Punktzahl von 2,31 - 2,59, gleichbedeutend mit einer nicht durch AVT bzw. Dehydratation induzierbaren AQP-2 Translokation in die apikale Zellmembran [Yang *et al.*, 2004; Nishimura, 2008]. Für proximale Tubuli ergaben sich, unabhängig von der Tiergruppe, Punktzahlen zwischen 1,07 und 1,13, ebenso für die Henle-Schleifen (1,04 - 1,09), gleichbedeutend mit einem Defizit an AQP-2 immunpositiven Epithelzellen in diesen Nephronabschnitten.

#### ***4.6.1. Die Bedeutung der PKA, der PKA-Ankerproteine, des Calciums sowie der Phosphorylierung im Rahmen der AVP-induzierten AQP-2 Translokation***

Die Bindung von AVP an den V<sub>2</sub>-Rezeptor in der basolateralen Membran von Hauptzellen der Säugerniere bedingte G<sub>α</sub>-GTP vermittelt eine Induktion der membranständigen Adenylatzyklase mit Bildung des *second messenger* cAMP [Bichet, 1998; Boone und Deen, 2008]. Die nachfolgende, cAMP-induzierte Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) führte zu einer schnellen Phosphorylierung ( $\leq 1$  min) von Ser<sup>256</sup> im Bereich des intrazellulären C-

Terminus vesikulär gespeicherter AQP-2 Monomere [Fushimi *et al.*, 1993; Nishimoto *et al.*, 1999], entsprechend dem Zeitverlauf der AVP-stimulierten Wasserpermeabilität im Bereich der Sammelrohre [Wall *et al.*, 1992]. Dieser Phosphorylierungsprozess erwies sich nun als entscheidend für die Initiation der zellulären Translokation [Kuwahara *et al.*, 1995; Lande *et al.*, 1996; Katsura *et al.*, 1997], wobei mindestens drei der Monomere eines funktionellen Tetrahomomers an Ser<sup>256</sup> phosphoryliert werden mußten, um eine Translokation von AQP-2 in die apikale Plasmamembran der Hauptzellen zu induzieren [Kamsteeg *et al.*, 2000; Boone und Deen, 2008]. Punktmutationen im Bereich von Ser<sup>256</sup> hatten folgerichtig den Verlust einer gerichteten Translokation von AQP-2 in transfizierten LLC-PK1 Zellen zur Folge [Fushimi *et al.*, 1997; Katsura *et al.*, 1997]. Eine weitere Voraussetzung für die Translokation des AQP-2 beim Säuger stellte die Bindung der PKA durch spezifische Ankerproteine (AKAPs) dar, welche als Gerüstproteine fungieren und dadurch die fokussierte Aktivierung der PKA in unmittelbarer Umgebung ihres Substrates (z.B. des AQP-2 Wasserkanals) ermöglicht [Colledge und Scott, 1999; Smith und Scott, 2002; Wong und Scott, 2004]. So konnte die experimentelle Unterbindung der PKA-AKAP Interaktion signifikant die zelluläre AQP-2 Translokation beeinträchtigen [Klussmann *et al.*, 1999; 2000; 2001a].

Zusätzlich zu cAMP als klassischem *second messenger* der ADH-Wirkung kommt intrazellulären Calciumsignalen eine Schlüsselrolle im Rahmen vesikulärer AQP-2 Translokationsprozesse sowie der finalen Fusion der Membranvesikel mit der Zielmembran zu [Burgoyne und Morgan, 1995]. Die durch Calcium induzierte AQP-2 Translokation erwies sich dabei als cAMP- und IP<sub>3</sub>-unabhängig. In isoliert perfundierten Sammelrohren der inneren Markzone (IMCDs) der Rattenniere ließ sich durch Pufferung des intrazellulären Calciums mit der Chelatorsubstanz BAPTA die AVP-induzierte, luminale Permeabilität für Wasser vollständig blockieren. Es scheinen sowohl die intrazelluläre Freisetzung von Calciumionen als auch deren Einstrom aus dem Extrazellulärraum wichtig zu sein [Yip, 2002]. In hoher Konzentration (100 µM/L) wirkt das Alkaloid Ryanodin als Blocker des Ryanodinrezeptors in der Membran des endoplasmatischen Reticulum zur Freisetzung gespeicherten Calciums. Sein experimenteller Einsatz in der oben genannten Sammelrohr-Präparation verursachte die Unterdrückung der Translokation vesikulär gespeicherter AQP-2 Kanäle zur Plasmamembran [Chou *et al.*, 2000].

Eine erhöhte extrazelluläre Calciumkonzentration ( $> 2\text{mM/L}$ ) könnte andererseits als negativer Regulator der AQP-2 Translokation in den Hauptzellen der Sammelrohre fungieren, wobei Plasmamembran-intrinsische Calciumrezeptoren als Sensoren dienen, ähnlich denen in Zellen der Parathyreoidea zur Registrierung der extrazellulären Calciumkonzentration [Brown *et al.*, 1995; Hebert *et al.*, 1997; Riccardi *et al.*, 1998; Hofer und Brown, 2003]. Studien an isoliert perfundierten IMCDs von mit Dihydroxyachysterol (Vitamin D<sub>3</sub>-Analogon) behandelten Rattennieren zeigten, dass die AVP- bzw. Forskolin-induzierte luminale Permeabilität für Wasser bzw. die intrazelluläre AQP-2 Expression und Translokation in Gegenwart einer apikal hohen Calciumkonzentration signifikant reduziert werden konnten [Sands *et al.*, 1997, 1998; Procino *et al.*, 2004]. Die inhibitorische Wirkung einer erhöhten extrazellulären Calciumkonzentration scheint durch die Beteiligung eines Calciumsensor-assoziierten G<sub>i</sub>-Proteins vermittelt zu werden [Brown *et al.*, 1993; Arthur *et al.*, 1997]. Der Calcium-abhängige Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration könnte nachfolgend eine Ca<sup>2+</sup>-sensible Isoform der Adenylatzyklase hemmen [De Jesus Ferreira und Bailly, 1998] bzw. die Hydrolyse des gebildeten cAMP beschleunigen [Aarab *et al.*, 1993].

Von mehreren möglichen Übereinstimmungssequenzen für Kinasen repräsentiert lediglich Ser<sup>256</sup> eine Phosphorylierungsposition mit Bedeutung für die AQP-2 Translokation in die apikale bzw. laterale Zellmembran [Kuwahara *et al.*, 1995]. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die AQP-2 Translokation durch Applikation des Ser/Thr-Phosphatase Inhibitors Okadasäure selbst in Anwesenheit von H89, einem spezifischen PKA-Inhibitor, induziert werden konnte [Valenti *et al.*, 2000], also PKA-unabhängig. In AQP-2 transfizierten Epithelzellen der Sammelrohre konnten Bouley und Mitarbeiter [2000] folgerichtig experimentell *in vitro* und *in vivo* nachweisen, dass auch ein Anstieg der intrazellulären cGMP Konzentration eine Umverteilung von AQP-2 durch eine PKG-abhängige Phosphorylierung des AQP-2 an Ser<sup>256</sup> AVP- sowie cAMP-unabhängig erfolgen konnte. Darüber hinaus wurde demonstriert, dass AQP-2 rasch zwischen intrazellulären Speicherkompartimenten und der Zelloberfläche selbst unter Benutzung eines phosphorylierungsunabhängigen Prozesses recycelt werden kann [Lu *et al.*, 2004].

#### ***4.6.2. Die Bedeutung des Zytoskeletts und SNARE-Komplexes im Rahmen der AVP-induzierten AQP-2 Translokation***

In Säugerniere und Krötenblase scheint die koordinierte Exozytose AQP-2 haltiger Membranvesikel von deren Translokation entlang zytoskelettaler Elemente, vor allem des mikrotubulären Netzwerkes abhängig zu sein [Bourguet *et al.*, 1988; Valenti *et al.*, 1988; Phillips und Taylor, 1989 1992]. Mikrotubuli richten sich in polarisierten Epithelzellen wie der caninen Nierenzelllinie MDCK in einer baso-apikalen Achse aus und organisieren sich darüber hinaus als zytoplasmatisches, subapikal-horizontales Netzwerk [Musch, 2004; Tajika *et al.*, 2005]. Sowohl Dynein als auch Dynactin als Proteinkomplex, der vermutlich die Interaktion des Dyneins mit den Vesikeln vermittelt, konnten AQP-2 assoziiert nachgewiesen werden [Marples *et al.*, 1998]. Die Zerstörung mikrotubulärer Strukturen durch Nocodazol oder Colcemid hatte eine transiente Verteilung von AQP-2 in der apikalen Zellmembran und spätere Redistribution in EEA1-immunpositiven Vesikeln zur Folge, repräsentativ für Endozytose zu frühen Endosomen [Tajika *et al.*, 2005]. In der Krötenblase vermochten Vanadat und Erythro-9 (3-(2-hydroxyonyl))-Adenin, ein relativ spezifischer Inhibitor des Dyneins, die AVTerge Wirkung zu hemmen [de Sousa und Grosso, 1979; Marples *et al.*, 1996].

Aufgrund der kontrollierten apikalen Positionierung des AQP-2 wird beim Säuger die Existenz von Proteinen vermutet, die AQP-2 direkt binden, wie das von Noda und Mitarbeitern [2004a, 2004b, 2005] beschriebene Aktin sowie SPA-1 [Boone und Deen, 2008]. Das „Myelin und Lymphozyten assoziierte Protein“ MAL wird konstitutiv in der apikalen Membran der Sammelrohrzellen exprimiert. Eine Interaktion von AQP-2 mit MAL führt folgerichtig zu einer vornehmlich apikalen Insertion des AQP-2 [Kamsteeg *et al.*, 2007; Boone und Deen, 2008]

Zumindest gleichbedeutend mit den Mikrotubuli sind nach heutigem Wissensstand Aktinfilamente im apikalen Kompartiment der Hauptzellen medullärer Sammelrohre für die hydrosmotische Reaktion auf AVP-Einwirkung. So sind Mikrofilamente wie F-Aktin an der abschließenden Bewegung der Vesikel durch das terminale apikale Gewebe, die Fusion mit der Plasmamembran sowie die nachfolgende endozytotische Rückgewinnung der

Wasserkanäle beteiligt [Pearl und Taylor, 1985; Tajika *et al.*, 2005]. Dabei bewirkte AVP immer eine Depolymerisierung von apikalem F-Aktin zum G-Aktin, wodurch die Fusion AQP-2 haltiger Vesikel mit der apikalen Plasmamembran ermöglicht wurde [Simon *et al.*, 1993]. Forskolin sowie Odakasäure als spezifischer Phosphataseinhibitor stimulierten ebenfalls die AQP-2 Translokation durch Induktion einer Aktindepolymerisation im apikalen Netzwerk [Valenti *et al.*, 2000]. Das Gleichgewicht zwischen Polymerisation und Depolymerisation des F-Aktins stellt somit eine Schlüsselposition für die geregelte AQP-2 Translokation und apikale Exozytose dar [Klussmann *et al.*, 2001b]. Experimentell induzierte Scherkräfte an der apikalen Oberfläche primär kultivierter Hauptzellen medullärer Sammelrohre, wie sie im Falle einer Hypertonizität des Interstitiums auftreten, verursachten eine zeitabhängige Depolymerisation des F-Aktins mit zeitgleicher Expression von AQP-2 in der Plasmamembran [Jang *et al.*, 2011].

Dabei konnten schon vor nahezu 10 Jahren Hinweise auf eine Beteiligung der kleinen GTPase RhoA erbracht werden. Kleine intrazelluläre Rho-GTPasen regulieren allgemein zahlreiche zelluläre Vorgänge wie die Organisation und den Umbau des Aktinzytoskeletts, den Vesikeltransport und die Rezeptor-vermittelte Endozytose [Lamaze *et al.*, 1996, 1997; Murphy *et al.*, 1996]. So führte die Aktivierung der GTPase RhoA *per se* zur Hemmung der AQP-2 Translokation in mit rAQP-2 cDNA transfizierten RC-SV3 Sammelrohrzellen der Kaninchenniere, vermutlich durch Induktion der Polymerisation von Aktin. AVP bzw. cAMP vermochten über eine Komplexierung von RhoA mit deren Inhibitor Rho-GDI folgerichtig die Translokation von AQP-2 zu verstärken [Tamma *et al.*, 2001, 2003a]. In mit rAQP-2 transfizierten RC-SV3 Sammelrohrzellen des Kaninchens stellten sogenannte ERM-Proteine wie z.B. Moesin eine Kreuzvernetzung von Aktinfilamenten mit Plasmamembranproteinen her und führten somit zur AQP-2 Translokation [Tamma *et al.*, 2005]. Analysen an immunisolierten, AQP-2 haltigen Vesikeln medullärer Sammelrohrzellen postulierten darüber hinaus die Existenz eines dynamischen Proteinkomplexes mit  $\beta$ - und  $\gamma$ -Isoformen des Aktins [Noda *et al.*, 2004b, 2005] sowie mehreren, muskulären und nicht-muskulären Myosinisformen [Barile *et al.*, 2005]. So konnten Chou und Mitarbeiter [2004] in rattenspezifischen IMCD-Zellen zeigen, dass die AQP-2 bedingte Steigerung der Wasserpermeabilität partiell auf die Aktivierung der Calcium/Calmodulin-abhängigen Myosin-Leichtketten-Kinase zurückzuführen war.

Der experimentelle Einsatz eines AQP-2 spezifischen Antikörpers ermöglichte die Immunisolation AQP-2 enthaltender, intrazellulärer Vesikel aus der Rattenniere; die nachfolgende LC-MS/MS basierte Proteom-Analyse machte deutlich, dass AQP-2 in Endosomen aber auch Membranstrukturen des Trans-Golgi Netzwerks (TGNs) sowie des rauen ERs eingebaut vorkommt [Barile *et al.*, 2005]. In der vorliegenden Arbeit ließ sich AQP-2 sowohl nach Dehydratation als auch systemischer AVT-Applikation immunhistochemisch vermehrt in subapikalen Vesikeln von Hauptzellen medullärer und corticaler Sammelrohre der Hühnerniere nachweisen, wie auch z.B. für die Rattenniere beschrieben [Kirk und Schäfer, 1992; Nielsen *et al.*, 1993a; Mütze *et al.*, 2008]. Der molekulare Mechanismus für Andocken und Fusion der AQP-2 haltigen Vesikel an/mit einer bestimmten Stelle der apikalen Plasmamembran renaler Hauptzellen sind bis *dato* nur für die Säugerniere detailliert nachgewiesen und weisen Ähnlichkeiten zum Prozess der synaptischen Vesikelfusion mit der präsynaptischen Membran in neuronalen Systemen auf, inklusive der Existenz des SNARE-Systems (soluble NSF attachment receptor). Dabei interagieren spezifische Proteine der vesikulären Membran (v-SNAREs) mit solchen der Plasmamembran (t-SNAREs) und Komponenten eines Fusionskomplexes [Brunger *et al.*, 2009]. Einige v-SNAREs konnten immunhistochemisch in den Hauptzellen der Sammelrohre mit AQP-2 in denselben Vesikeln co-lokalisiert werden [Franki *et al.*, 1995; Jo *et al.*, 1995; Nielsen *et al.*, 1995b]. Die Behandlung mit Tetanus Neurotoxin, welches das v-SNARE Protein VAMP-2 zu spalten vermag, inhibierte die AVP- bzw. cAMP-induzierte AQP-2 Translokation zur Plasmamembran in Sammelrohrzellen des Kaninchens vollständig, wobei die Anzahl Plasmamembran-assoziiierter Wasserkanäle nicht beeinflusst wurde [Gouraud *et al.*, 2002]. Die t-SNARE Proteine Syntaxin4 und SNAP23 konnten in der apikalen Zellmembran renaler Hauptzellen demonstriert werden [Mandon *et al.*, 1996, 1997; Inoue *et al.*, 1998]. Beide Proteine gehen im Rahmen der Vesikelfusion eine Bindung mit VAMP-2 ein [Ravichandran *et al.*, 1996].

Während des endozytotischen Prozesses des „recycling“ werden AQP-2 Wasserkanäle in Clathrin-beschichteten Membraninvaginationen internalisiert [Brown und Orci, 1983; Brown *et al.*, 1988; Strange *et al.*, 1988; Sun *et al.*, 2002]. Es konnte nachgewiesen werden, dass AQP-2 sich im Bereich der Plasmamembran AVP-unabhängig anreichert, wenn die Clathrin-vermittelte Endozytose durch GTPase-defizientes Dynamin gehemmt

wird [Sun *et al.*, 2002], wobei Dynamin in der Anordnung und dem „Abklemmen“ von clathrin-beschichteten Vesikeln involviert ist [Hinshaw, 2000; Mc Niven *et al.*, 2000; Sever *et al.*, 2000]. Schon 15 min nach pharmakologischer Hemmung der Endozytose konnte eine Aggregation von AQP-2 Molekülen an der Zelloberfläche detektiert werden, wodurch demonstriert werden konnte, dass der grundlegende Translokationsprozess nicht von der Phosphorylierung des AQP-2 an Ser<sup>256</sup> abhängig war.

#### **4.6.3. Translokation des AQP-2 Wasserkanals in die basolaterale Zellmembran**

In der vorliegenden Arbeit zur regulierten Translokation von AQP-2 in der Hühnerniere konnte gezeigt werden, dass eine akute AVT-Exposition *in vivo* zu einer signifikanten Translokation des Wasserkanals nicht nur in die apikale, sondern vor allem auch laterale Zellmembran corticaler, aber auch medullärer Sammelrohrzellen führte. Wenngleich AQP-2 in der Säugerniere in erster Linie in die apikale Plasmamembran transportiert wird [Fushimi *et al.*, 1993; Nielsen *et al.*, 1993b], war schon früheren AQP-2 Translokationsstudien zu entnehmen, dass der Wasserkanal in den Hauptzellen der Verbindungstubuli und Sammelrohre der inneren Medulla teilweise auch an der basolateralen Oberfläche exprimiert wurde [Nielsen *et al.*, 1995b; Breton und Brown, 1998; Coleman *et al.*, 2000; Christensen *et al.*, 2003]. So resultierte die akute Inkubation von Nierenschnittpräparationen der Ratte bei internalisierten AQP-2 Wasserkanälen mit AVP (10 nM/L) und Forskolin (10 µM/L) in einer markanten AQP-2 Translokation in die apikale sowie moderaten in die basolaterale Plasmamembran in Hauptzellen des proximalen inneren Nierenmarks. Hauptzellen des distalen inneren Nierenmarks hingegen demonstrierten eine ausgeprägte Immunlokalisation von AQP-2 primär in der lateralen Plasmamembran [Van Balkom *et al.*, 2002]. In stabil GFP-AQP-2 transfizierten LLC-PK1 bzw. MDCK Zellen bedingte eine Stimulation mit AVP bzw. cAMP einen Einbau des Wasserkanals in die basolaterale (LLC-PK1) bzw. apikale und basolaterale (MDCK) Plasmamembrane(n) [Katsura *et al.*, 1995; Umenishi *et al.*, 2000]. Funktion, Translokation und Regulation heteromerer Proteinkomplexe sind unterschiedlich im Vergleich zu solchen homomerer Aggregate [Krapivinsky *et al.*, 1995; Bouvier, 2001]. Die Annahme der Möglichkeit, dass AQP-2 teilweise in die basolaterale Plasmamembran aufgrund der Bildung von Heterotetrameren mit AQP-3 und/oder AQP-4 erfolgte, erwies sich zumindest für die Säugerniere als nicht zutreffend [Walz *et al.*, 1997; Kamsteeg *et al.*, 1999; Neely *et al.*, 1999; Hasler *et al.*, 2008]. „Frame-shift“ Muta-

tionen im Bereich des intrazellulären C-Terminus von humanem AQP-2 führten zu einer Verlängerung des C-terminalen Endes um etwa 60 Aminosäuren und Induktion eines nephrogenen *Diabetes insipidus*. Nach stabiler Transfektion in MDCK-Zellen kam es entweder zu einem vollständigen Verlust der Translokation in die Plasmamembran oder zu einer Fehl-Translokation in die basolaterale Zellmembran [Kuwahara *et al.*, 2001, 2005; Asai *et al.*, 2003]. Der AQP-2 spezifische C-Terminus scheint somit für das apikale „trafficking“ von besonderer Bedeutung zu sein.

Der corticomedulläre osmotische Gradient stellt in der Säuger- wie auch Vogelniere die treibende Kraft für die Wasserreabsorption im Bereich der Sammelrohre dar, wodurch die epitheloiden Tubuluszellen gezwungen werden, permanent ihr Zellvolumen und alle intrazellulären, funktionalen Abläufe an eine sich ändernde extrazelluläre Tonizität anzupassen [Bentley, 1964; Jarausch und Ullrich, 1965; Bourguet *et al.*, 1976; Kondo *et al.*, 2006]. Bis dato deuten die meisten Untersuchungen an Nierengewebschnitten sowie renalen Zelllinien mit akut ausgelöster Hypertonizität darauf hin, dass AQP-2 Wasserkanäle primär in die apikale Membran eingebaut werden [Hasler *et al.*, 2008; Hasler, 2009]. Neben der AVP-Stimulation bedingte dagegen in Nierenschnitten AVP-defizienter Brattleboro-Ratten eine über 11 Tage aufrechterhaltene interstitielle Hypertonizität durch Dauerapplikation des V<sub>2</sub>-Rezeptor Agonisten dDAVP *in vivo* eine um den Faktor 14 vermehrte Insertion von AQP-2 in die basolaterale Zellmembran von Sammelrohrepithelzellen [Van Balkom *et al.*, 2002]. Dabei wird diskutiert, ob eine erhöhte interstitielle Hypertonizität unabhängig von den enzymatischen Aktivitäten der Adenylatzyklase oder der PKA zu einer vermehrten Transkription des AQP-2 Gens führt(e) [Hasler, 2009]. Es kam offensichtlich zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors „tonicity responsive enhancer binding protein“ (TonEBP), welcher nach Bindung an die DNA-Sequenz NFAT1 die vermehrte Transkription von AQP-2 induzierte [Kasono *et al.*, 2005; Hasler, 2009]. Klassischerweise werden neu synthetisierte Proteine ausgehend vom TGN selektiv zur apikalen oder basolateralen Domäne transportiert. Die Bedeutung des TGNs im Rahmen des „protein sorting“ für AQP-2 liegt nun darin, dass unterschiedliche Stimuli entweder eine Translokation in die apikale (AVP-Applikation und akute Hypertonizität) bzw. basolaterale (AVP-Applikation und anhaltende Hypertonizität) Plasmamembran herbeiführen [Hasler, 2009]. Die Sammelrohre des medullären Markkegels der Hühnerniere betreffend induzierte sowohl die 40-stündige Dehy-

dratation als auch die akute AVT-Infusion eine AQP-2 Translokation primär in die apikale Plasmamembran. Für die Bereiche des *Cortex renalis* und des corticalen Markkegels hingegen erfolgte nach Dehydratation vorwiegend eine gesteigerte AQP-2 Expression in der apikalen Plasmamembran, während die akute AVT-Infusion eine Translokation des Wasserkanals vorrangig in die laterale Plasmamembran induzierte.

AQP-2 kann in die apikale Plasmamembran über verschiedene Transportwege gelangen. So könnte der Wasserkanal die Membran direkt vom TGN ausgehend über sekretorische Vesikel erreichen. Andererseits kommt es laut Polishchuck und Mitarbeitern [2004] im Rahmen der AQP-2 Translokation zur Freisetzung von an intramembranalem Glycosylphosphatidylinositol verankerten Proteinen, welche sich in die basolaterale Plasmamembran integrieren und von dort AQP-2 mittels eines Clathrin-freien Transports über das Zytosol in die apikale Membran transferieren [Muth und Caplan, 2003]. Für beide Prozesse mit finaler Oberflächenexpression des Wasserkanals AQP-2 stellt die N-Glycosylierung eine unabdingbare Voraussetzung dar [Hendriks *et al.*, 2004]. Auf diese Weise ließe sich das immunhistochemische Ergebnis sowohl der apikalen als auch der lateralen Membraninsertion im Sinne einer AQP-2 spezifischen Umverteilung erklären. AQP-2 würde also zunächst in die basolaterale Plasmamembran befördert und anschließend durch Transzytose in die apikale Plasmamembran umgesteuert, wie auch für andere Proteine beschrieben [Brown und Stow, 1996]. Die physiologische Relevanz der lateralen Lokalisation von AQP-2 könnte somit ein Art Schutzmechanismus zur Limitierung des apikalen Wassereinstroms - und damit zellulären Hypervolämie - im Falle einer ausgeprägten interstitiellen Hypertonizität darstellen, bei welcher es darüber hinaus zu einem ansteigenden Wasserausstrom aus der Zelle über basolateral liegende AQP-3 und AQP-4 Wasserkanäle kommt [Ishibashi *et al.*, 1994; Terris *et al.*, 1995; Van Balkom *et al.*, 2002; Tamma *et al.*, 2007].

## 5. KAPITEL Zusammenfassung

Das in magnozellulären Kerngebieten des Hypothalamus gebildete und in der Neurohypophyse gespeicherte antidiuretische Hormon (ADH) bewirkt bei Säugetieren sowie Vögeln eine ausgeprägte renale Antidiurese. Dabei ist bei Säugern sowohl der rezeptive Mechanismus in den Hauptzellen der Sammelrohre (G-Protein gekoppelter, 7-transmembranaler V<sub>2</sub>-Rezeptor), die nachfolgende intrazelluläre Signaltransduktion (cAMP Bildung, Aktivierung der Proteinkinase A) sowie die finale Phosphorylierung vesikulär gespeicherter Wasserkanäle (= Aquaporin-2 = AQP-2) und deren Translokation in die luminalen Zellmembran eingehend untersucht. Bei Vögeln hingegen konnten zwar die Hauptzellen der Sammelrohre ebenfalls als wahrscheinlichste Zielstruktur für ADH identifiziert werden. Die molekulare Entität des Rezeptors sowie die nachgeschaltete Signaltransduktion hingegen bleiben bis *dato* ungeklärt. Hinsichtlich der Bedeutung eines vogelspezifischen AQP-2 liegen erste Daten für die Wachtel, eingeschränkt auch für das Huhn vor.

Primäres Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war daher der zelluläre Expressionsnachweis für den Wasserkanal AQP-2 sowie dessen ADH-induzierte Translokation in die apikale (bzw. auch laterale) Plasmamembran von Epithelzellen bestimmter Tubulussegmente der Hühnerniere mit Bezug zur Körperflüssigkeitshomöostase. Serielle Gewebsschnitte von in Paraffin eingebetteten Hühnernieren nach transkardialer Perfusionsfixation ermöglichten zunächst aufgrund einer Hämatoxylin-Eosin Färbung die eindeutige Identifizierung der für die Vogelniere charakteristischen „säugerähnlichen“ sowie „reptilienähnlichen“ Glomerula sowie Epithelien aller tubulären Segmente, wie des proximalen Tubulus, der Henleschen Schleife, des distalen Tubulus sowie corticaler und medullärer Sammelrohre.

Für den immunhistochemischen Nachweis des AQP-2 in der Hühnerniere kam ein gegen rattenspezifisches AQP-2 gerichtetes, polyclonales Antiserum in Form affinitätsgereinigter IgGs zum Einsatz. Durch indirekte Immunfluoreszenz konnte eine AQP-2 Expression selektiv in der Mehrzahl der Hauptzellen aus den Bereichen des *Cortex renalis*, corticaler sowie medullärer Sammelrohre, nicht jedoch anderen Zellen bzw. tubulären Komponenten der Hühnerniere aufgezeigt werden. Die Spezifität der Markierung konnte durch Kontroll-

versuche (z.B. Absättigen der IgGs mit dem entsprechenden Antigen) untermauert werden. Interkalierende Schaltzellen der Sammelrohre aller drei Nierenbereiche waren durch das Fehlen des AQP-2 Wasserkanals, dafür jedoch ausgeprägte Expression der Carboanhydrase II charakterisiert, ganz im Sinne ihrer Beteiligung an der Regulation des aviären Säure-Basen Haushaltes.

Zur Untersuchung [1] der Translokation des Wasserkanals AQP-2 in die apikale und/oder laterale Plasmamembran der Hauptzellen, [2] einer möglichen Beteiligung von cAMP als *second messenger* für das vogelspezifische, antidiuretische Hormon [Arg<sup>8</sup>]Vasotocin = AVT, sowie [3] der Verteilung und Quantifizierung des Rezeptors für AVT in der Hühnerniere wurden für jeden dieser drei experimentellen Versuchsansätze drei Gruppen junger Hühner herangezogen. Neben einer euhydrierten Kontrollgruppe (EUH) wurde einer zweiten Tiergruppe zur endogenen Stimulation des AVT-Systems für 40 Std. das Trinkwasser entzogen (DEH); einer dritten Versuchstiergruppe wurde akut für 30 min AVT (5 ng/min/kg KG) systemisch infundiert (AVT). Während die DEH-Hühner gegenüber der EUH-Kontrollgruppe bei extrazellulärer Hypovolämie und Hypernaträmie eine um den Faktor 3 stimulierte AVT Plasmakonzentration aufwiesen, war diese in der AVT-Gruppe bei unveränderten Werten des Extrazellularraumes um das 7-fache erhöht.

Die homogene AQP-2 Expression vorrangig im Bereich des supranukleären bis subapikalen Zytosolbereichs der sammelrohrspezifischen Hauptzellen spiegelte die Situation des in Speichervesikeln vorliegenden, „ruhenden“ AQP-2 Wasserkanals bei Tieren der EUH-Gruppe wieder und stellte somit die unstimulierte Ausgangssituation des AQP-2 Translokationsprozesses dar. Der Entzug des Trinkwassers (DEH-Gruppe) resultierte in einer signifikanten Zunahme der vesikelassoziierten AQP-2 Expression im gesamten Zytosol der Hauptzellen vor allem im Bereich des *Cortex renalis* und corticaler Markkegel, weniger der medullären Sammelrohre. Darüber hinaus kam es zu einer Translokation des Wasserkanals vorrangig in die luminale, in geringem Maße auch die laterale Zellmembran der Epithelzellen. Die systemische AVT-Applikation hingegen resultierte in einer ausgeprägten Translokation von AQP-2 primär in die laterale sowie teilweise auch in die luminale Zellmembran. Die Beteiligung intrazellulärer Komponenten des Zytoskeletts sowie von SNARE-Proteinen, sowie die mögliche Funktion einer eher lateralen anstatt rein apikalen

AQP-2 Translokation bei akut erhöhten AVT-Plasmakonzentrationen werden diskutiert. Ebenfalls immunhistologische Untersuchungen zu einer möglichen Funktion von cAMP in Rahmen des AVT-induzierten AQP-2 Transfers, durch den Einsatz eines cAMP spezifischen Antikörpers, haben keine eindeutigen, eher negative Ergebnisse erbracht. Dieses Ergebnis lässt sich durch zahlreiche Befunde in der Fachliteratur stützen.

Die Verwendung des Radioliganden [<sup>3</sup>H]Vasopressin ermöglichte es, in einer angereicherten Plasmamembranfraktion der Hühnerniere mittels Sättigungskinetiken die Affinität ( $K_D$ ) sowie Dichte ( $B_{max}$ ) eines AVT-rezeptiven Systems zu bestimmen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die endogene Stimulation des AVT-ergen Systems (DEH), vor allem aber die exogene Applikation des Nonapeptides (AVT) zu einer Down-Regulation des putativen Rezeptors bei unveränderter Bindungsaffinität führte. Kompetitive Verdrängungsstudien mit AVT-Strukturanaloga sowie Agonisten für bestimmte Subtypen des säugerspezifischen ADH-Rezeptors ergaben eindeutig die höchste Bindungsaffinität für AVT, bei marginaler Affinität für V<sub>2</sub>-Rezeptor spezifische Analoga. Es konnte nachgewiesen werden, dass der renal exprimierte AVT-Rezeptor des Huhnes unterschiedliche Charakteristika im Vergleich zu den V<sub>1a</sub>-, V<sub>1b</sub>- oder V<sub>2</sub>-Rezeptorsubtypen des Säugers aufweist. Die abschließende rezeptorautoradiographische Analyse konnte die funktionelle Expression des mit dem Radioliganden markierten Rezeptors im Bereich der „reptilienähnlichen“ Glomerula sowie des Sammelrohrbereichs nachweisen.

Eine Aktivierung des vogelspezifischen ADH-Systems führte somit einerseits zu einer moderaten Down-Regulation des entsprechenden, zur Situation beim Säuger jedoch unterschiedlichen Rezeptorsystems in der Niere des Huhnes; die Beteiligung von cAMP als klassischem *second messenger* des ADH bei Säugern konnte in den durchgeführten Studien an der Hühnerniere nicht eindeutig geklärt werden. Interessanterweise bewirkte die durch extrazelluläre Dehydratation erhöhte Plasmakonzentration an AVT in erster Linie eine Translokation des Wasserkanals AQP-2 aus seiner vesikelassoziierten, zytosolischen Position primär in die luminale Plasmamembran, wohingegen systemisch verabreichtes AVT zu einer AQP-2 Translokation vornehmlich in die laterale Plasmamembran führte.

## Summary

In both mammalian and avian species, the antidiuretic hormone (ADH) - synthesized in magnocellular neurons of the hypothalamus and stored in the neurohypophysis - induces marked antidiuresis at the level of the kidneys. For mammals, the underlying hormone receptive mechanism in principal cells of nephronal collecting ducts (G-protein coupled, 7-transmembranal receptor), the intracellular signalling pathway involved (cAMP formation, protein kinase A activation) and the final steps of phosphorylation of vesicularly stored water channels = aquaporin-2 = AQP-2 with subsequent cellular translocation to the luminal plasma membrane have been elucidated in detail. With regard to the avian kidney, also principal cells of the cortical and medullary collecting ducts could be identified as the most likely target structure for circulating ADH = [arg<sup>8</sup>]vasotocin = AVT to exert its action. The molecular entity of the receptor as well as the intracellular signalling pathway remain, however, rather unclear. First data became available recently concerning structure and regulated expression of the water channel AQP-2 in the kidney of the quail, and to a limited extent the chicken.

The primary goal of the thesis therefore has been to shed light on the cellular expression pattern of AQP-2 in the chicken kidney, with special emphasis being placed upon the AVT-induced AQP-2 translocation into the luminal and/or lateral plasma membranes of nephronal cells of certain tubular segments concerned with the efferent control of body fluid homeostasis. Serial tissue sections of paraffin-embedded, perfusion-fixed chicken kidneys, after staining with hematoxylin-eosin, enabled the clear identification of both "reptilian-type" and "mammalian-type" glomerula, as well as epithelia of all tubular segments including proximal tubules, the loops of Henle, distal tubules and cortical/medullary collecting ducts.

Affinity-purified IgGs of a polyclonal rabbit antiserum directed against rat-specific AQP-2 have been employed for the immunohistochemical detection of the water channel in the chicken kidney. Using indirect immunofluorescence, AQP-2 expression could selectively be demonstrated in the majority of principal cells of collecting ducts within the *cortex renalis*, and both cortical and medullary cone regions. Other cells and tubular structures of

the chicken kidney, however, could not be immunolabeled positively. Specificity of labeling was supported by preincubation of the antibody with the respective antigen. Intercalating cells of the collecting ducts within all three segments of the kidney investigated could be characterized by the lack of AQP-2 but marked carbonic dehydratase II expression.

In order to elucidate [1] the translocation process for AQP-2 into the luminal and/or lateral plasma membrane of principal cells, [2] the putative contribution of cAMP as a *second messenger* for avian-specific AVT, as well as [3] the distribution and quantification of receptors for AVT in the chicken kidney, three groups of juvenile chicken were formed for each of these projects. Besides a euhydrated control group (EUH), drinking water was withdrawn for 40 hrs for a second group of animals, rendering them dehydrated (DEH) with an endogenously activated ADH-system. AVT was acutely applied to a third group of chicken by intravenous infusion (5 ng/min/kg BW) for 30 min (AVT). DEH animals proved to have a 4-fold elevated plasma AVT concentration when compared to the EUH group, under conditions of extracellular hypovolemia and hypernatremia, whereas the AVT group revealed an even 8-fold elevation of plasma AVT at unaltered status of the extracellular fluid compartment.

The homogeneous AQP-2 expression preferentially in the supranuclear to subapical zone of the principal cells reflected the situation of AQP-2 water channels being stored in cytosolic vesicles, “waiting” to be called upon stage; this status represents the non-stimulated starting condition before ADH-induced AQP-2 translocation. The withdrawal of drinking water (DEH group) resulted in a significant increase in vesicle-associated AQP-2 expression throughout the cytosol of principal cells localized in the *cortex renalis*, the cortical cones and to a lesser degree the medullary cones. Furthermore, in a major portion of collecting duct epithelial cells, the water channel proteins have been translocated to and into the luminal plasma membrane, with some cells also demonstrating immunolabeling for AQP-2 at the level of the lateral membranes. Systemic AVT infusion on the other hand caused pronounced translocation of water channel proteins into the lateral, partially also luminal plasma membrane sites. The contribution of intracellular cytoskeleton components and SNARE proteins, as well as the putative functionality of lateral rather than luminal AQP-2 membrane insertion under conditions of hyperosmolality and/or elevated plasma

AVT concentration is discussed. Additional immunohistochemical experiments trying to reveal the contribution of cAMP as a classical second messenger within the issue of AVT-induced AQP-2 translocation did not yield unequivocal results or even negative ones, thus supporting data collected over the years speaking against a role of cAMP as an important, AVT-induced messenger molecule in the avian kidney.

The application of the radioligand [<sup>3</sup>H]vasopressin allowed the determination of both the affinity ( $K_D$ ) and density ( $B_{max}$ ) of the AVT receptive system in the chicken kidney, employing an enriched plasma membrane fraction. It could be demonstrated, that the endogenous stimulation of the AVT system (DEH group), and even more so the systemic administration of AVT (AVT group) induced a down-regulation of the putative AVT receptor at unaltered binding affinity. Competitive displacement studies with AVT analogues and ligands for various ADH receptor subtypes showed highest affinity for AVT to displace [<sup>3</sup>H]AVP, with only marginal affinity for V<sub>2</sub> receptor agonist dDAVP. The renally expressed AVT receptor appears to possess binding characteristics different from classical mammalian V<sub>1a</sub>-, V<sub>1b</sub>- and V<sub>2</sub>-receptors. Receptor autoradiographical analysis led to the specific labelling of “reptilian-type” glomerula and cortical cone collecting tubules.

Activation of the avian-specific ADH (= AVT) system thus resulted in a moderate down-regulation the yet unknown renal AVT receptive system. The contribution of cAMP as a classical second messenger of ADH in mammals could not be clarified in the thesis presented. Extracellular dehydration with elevated plasma AVT levels caused a marked translocation of AQP-2 water channel proteins from its cytosolic, vesicle-associated location primarily into the luminal plasma membrane, whereas systemically administered AVT at unaltered status of the extracellular fluid compartment led to AQP-2 translocation into the lateral plasma membranes.

## 6. KAPITEL: Literaturverzeichnis

1. Aarab, L., Siaume-Perez, S., Chabardes, D., The activation of protein kinase C prevents PGE<sub>2</sub>-induced inhibition of AVP-dependent cAMP accumulation in the rat outer medullary collecting tubule. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 425, 417-425, 1993.
2. Absil, P., Papello, M., Viglietti-Panzica, C., Balthazart, J., Panzica, G., The medial preoptic nucleus receives vasotocinergic inputs in male quail: a tract-tracing and immunocytochemical study. *J. Chem. Neuroan.* 24, 27-39, 2002.
3. Acharjee, A., Do-Rego, JL., Oh, DY., Ahn, RS., Choe, H., Vaudry, H., Kim, K., Seong, JY., Kwon, HB., Identification of amino acid residues that direct differential ligand selectivity of mammalian and nonmammalian V<sub>1a</sub> type receptors for arginine vasopressin and vasotocin. *J. Biol. Chem.* 52, 54445-54453, 2004.
4. Acher, R., Molecular evolution of fish neurohypophysial hormones: neutral and selective evolutionary mechanisms. *Gen. Comp. Endocrinol.* 102, 157-172, 1996.
5. Acher, R., Chauvet, J., Structure, processing and evolution of the neurohypophysial hormone-neurophysin precursors. *Biochimie (Paris).* 70, 1197-1207, 1988.
6. Acher, R., Water homeostasis in amphibia: vasotocin and hydrins. *CR Seances Soc. Biol. Fil.* 189, 199-214, 1995.
7. Agre, P., Membran water transport and aquaporins: looking back. *Biol. Cell.* 97, 355-356, 2005.
8. Agre, P., The aquaporin water channels. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 3, 5-13, 2006.
9. Agre, P., The 2009 Lindau Nobel Laureate Meeting: Peter Agre, Chemistry 2003. *J. Vis. Exp.* 34,1565, 2009.
10. Amer, S., Brown, JA., Glomerular actions of arginine vasotocin in the *in situ* perfused trout kidney. *Am. J. Physiol.* 269, R775-R780, 1995.
11. Ames, E., Steven, K., Skadhauge, E., Effects of arginine vasotocin on renal excretion of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> and urea in the hydrated chicken. *Am. J. Physiol.* 221, 1223-1228, 1971.
12. Amiry-Moghaddam, M., Ottersen, OP., The molecular basis of water transport in the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 991-1001, 2003.
13. Ammar, A., Roseau, S., Butlen, D., Vasotocin-sensitive adenylate cyclase in frog glomeruli. *Gen. Comp. Endocrinol.* 98, 102-110, 1995.
14. Arad, Z., Skadhauge, E., Plasma hormones (arginine vasotocin, prolactin, aldosterone and corticosteron) in relation to hydration state, NaCl intake and egg laying in fowls. *J. Exp. Zool.* 232, 707-714, 1984.
15. Arima, H., Kondo, K., Kakiya, S., Nagasaki, H., yokoi, H., Yambe, Y., Murase, T., Iwasaki, Y., Oiso, Y., Rapid and sensitive vasopressin heteronuclear RNA responses to changes in plasma osmolality. *J. Neuroendocrinol.* 11, 337-341, 1999.
16. Arthur, JM., Collinsworth, GP., Gettys, TW., Quarles, LD., Raymond, JR., Specific coupling of a cation-sensing receptor to G-protein  $\alpha$ -subunits in MDCK cells. *Am. J. Physiol.* 273, F129-F135, 1997.

17. Asai, T., Kuwahara, M., Kurihara, H., Sakai, T., Terada, Y., Marumo, F., Sasaki, S., Pathogenesis of nephrogenic diabetes insipidus by aquaporin-2 C-terminus mutations. *Kidney Internat.* 64, 2-10, 2003.
18. Aukland, K., Oien, AH., Renal autoregulation: models combining tubuloglomerular feedback and myogenic response. *Am. J. Physiol.* 252, F768-F783, 1987.
19. Badaut, J., Lasbennes, F., Magistretti, PJ., Regli, L., Aquaporins in brain: distribution, physiology and pathophysiology. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 22, 367-378, 2002.
20. Baeyens, DA., Cornett, LE., The cloned avian neurohypophyseal hormone receptors. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 143, 12-19, 2006.
21. Baggaley, E., Nielsen, S., Marples, D., Dehydration-induced increase in aquaporin-2 protein abundance is blocked by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am. J. Physiol.* 298, 1051-1058, 2010.
22. Bai, L., Fushimi, K., Sasaki, S., Marumo, F., Structure of aquaporin 2 vasopressin water channel. *J. Biol. Chem.* 271, 5171-5176, 1996.
23. Balasubramanian, L., Sham, JSK., Yip, KP., Calcium signaling in vasopressin-induced aquaporin-2 trafficking. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 456, 747-754, 2008.
24. Ball, SG., Vasopressin and disorders of water balance: the physiology and pathophysiology of vasopressin. *Ann. Clin. Biochem.* 44, 417-431, 2007.
25. Bankir, L., Antidiuretic action of vasopressin: quantitative aspects and interaction between V1a and V2 receptor-mediated effects. *Cardiovasc. Res.* 51, 372-390, 2001.
26. Barberis, C., Mouillac, B., Durroux, T., Structural bases of vasopressin/oxytocin receptor function. *J. Endocrinol.* 156, 223-229, 1998.
27. Barile, M., Pisitkun, T., Yu, MJ., Chou, CL., Verbalis, MJ., Shen, RF., Knepper, MA., Large-scale protein identification in intracellular aquaporin-2 vesicles from renal inner medullary collecting duct. *Mol. Cell. Proteomics*, 4, 1095-1106, 2005.
28. Barth, SW., Grossmann, R., Localization of arginine vasotocin (AVT) mRNA in extrasomal compartments of magnocellular neurons in the chicken hypothalamo-neurohypophysial system. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 125, 189-195, 2000.
29. Bathgate, RA., Sernia, C., Regulation of neurohypophysial hormone secretion in an australian marsupial. *Am. J. Physiol.* 268, R1319-R1326, 1995.
30. Baylis, PH., Osmoregulation and control of vasopressin secretion in healthy humans. *Am. J. Physiol.* 253, R671-R678, 1987.
31. Bentley, PJ., Physiological properties of the isolated frog bladder in hyperosmotic solutions. *Comp. Biochem. Physiol.* 12, 233-239, 1964.
32. Bentley, PJ., Actions of neurohypophysial peptides in amphibians, reptiles and birds. In: *Handbook of Physiology. Endocrinology. The Pituitary Gland and its Neuroendocrine Control* (Eds: Knobil, E. and Sawyer, WH.), Am. Physiol. Soc., Washington, DC, 4, 545-563, 1974.
33. Besseghir, K., Rennick, B., Direct renal tubular effects of choline on electrolyte excretion in the chicken. *Am. J. Physiol.* 240, F211-F221, 1981a.

34. Besseghir, K., Rennick, B., Renal tubule transport and electrolyte effects of amiloride in the chicken. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 219, 435-441, 1981b.
35. Beyenbach, KW., Comparative physiology of the renal proximal tubule. *Renal Physiol.* 8, 222-236, 1985.
36. Bichet, DG., Nephrogenic diabetes insipidus. *Am. J. Med.* 105, 431-442, 1998.
37. Birnbaumer, M., Vasopressin receptors. *Trends Endocrine Metab.* 11, 406-409, 2000.
38. Birnbaumer, M., Seibold, A., Gilbert, S., Ishido, M., Barberis, C., Antaramian, A., Brabet, P., Rosenthal, W., Molecular cloning of the receptor for human antidiuretic hormone. *Nature*, 357, 333-335, 1992.
39. Bohus, B., de Wied, D., The vasopressin deficient Brattleboro rat: a natural knockout model used in the search for CNS effects of vasopressin. *Prog. Brain. Res.* 119, 555-573, 1998.
40. Bons, N., Immunocytochemical characterization of vasotocin and mesotocin secretory systems in duck brain. *CR. Seances Acad. Sci. D.* 290, 113-116, 1980a.
41. Bons, N., The topography of mesotocin and vasotocin systems in the brain of the domestic mallard and Japanese quail: immunocytochemical identification. *Cell. Tissue. Res.* 213, 37-51, 1980b.
42. Boone, M., Deen, P.M.T., Physiology and pathophysiology of the vasopressin-regulated renal water reabsorption. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 456, 1005-1024, 2008.
43. Borgnia, M., Nielsen, S., Engel, A., Agre, P., Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Ann. Rev. Biochem.* 68, 425-458, 1999.
44. Bottje, WG., Wang, S., Kinzler, S., Neldon, HL., Koike, TI., Plasma concentrations of arginine vasotocin and mesotocin following pentobarbital anaesthesia and carotid cannulation in domestic fowl. *Br. Poult. Sci.* 31, 189-195, 1990.
45. Boyd, SK., Moore, FL., Autoradiographic localization of putative arginine vasotocin receptors in the kidney of a urodele amphibian. *Gen. Comp. Endocrinol.* 78, 344-350, 1990.
46. Bouley, R., Breton, S., Sun, T., McLaughlin, M., Nsumu, NN., Lin, HY., Ausiello, DA., Brown, D., Nitric oxide and atrial natriuretic factor stimulate cGMP-dependent membrane insertion of aquaporin 2 in renal epithelial cells. *J. Clin. Invest.* 106, 1115-1126, 2000.
47. Bouley, R., Lin, H.Y., Raychowdbury, M.K., Marshansky, V., Brown, D., Ausiello, D.A., Downregulation of the vasopressin type 2 receptor after vasopressin-induced internalization: involvement of a lysosomal degradation pathway. *Am. J. Physiol.* 288, C1390-C1401, 2005.
48. Bourguet, J., Chevalier, J., Hugon, JS., Alterations in membrane associated particle distribution during antidiuretic challenge in frog urinary bladder epithelium. *Biophys. J.* 16, 627-639, 1976.
49. Bourguet, J., Hugon, J. S., Valenti, G., Svelto, M., ADH-induced water permeability: what role for the microtubular network? *Comp. Biochem. Physiol. A.* 90, 669-672, 1988.

50. Boykin, SL., Braun, EJ., Entry of nephrons into the collecting duct network of the avian kidney: a comparison of chickens and desert quail. *J. Morphol.* 216, 259-269, 1993.
51. Bouvier, M., Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 274-286, 2001.
52. Bradshaw, SD., Homeostasis of desert reptiles. Springer-Verlag, Heidelberg, 1997.
53. Bradshaw, FJ., Bradshaw, SD., Arginine vasotocin: locus of action along the nephron of the ornate dragon lizard, *Ctenophorus ornatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 103, 281-289, 1996.
54. Bradshaw, SD., Bradshaw, FJ., Arginine vasotocin: site and mode of action in the reptilian kidney. *Gen. Comp. Endocrinol.* 126, 7-13, 2002.
55. Braun, EJ., Intrarenal blood flow distribution in the desert quail following salt loading. *Am. J. Physiol.* 231, 111-1118, 1976.
56. Braun, EJ., Renal response of the starling (*Sturnus vulgaris*) to an intravenous salt load. *Am. J. Physiol.* 234, 270-278, 1978.
57. Braun, EJ., The role of the avian kidney in fluid and electrolyte balance. *Acta XXth Congr. Intern. Ornith.* 38, 2130-2137, 1991.
58. Braun, EJ., Dantzler, WH., Effects of ADH on single-nephron glomerular filtration rates in the avian kidney. *Am. J. Physiol.* 226, 1-12, 1974.
59. Braun EJ., Dantzler, WH., Function of mammalian-type and reptilian-type nephrons in kidney of desert quail. *Am. J. Physiol.* 222, 617-629, 1972.
60. Braun, EJ., Reimer, PR., Structure of avian loop of Henle as related to counter-current multiplier system. *Am. J. Physiol.* 255, F500-F512, 1988.
61. Braun, EJ., Stallone, J., The occurrence of nephrogenic diabetes insipidus in domestic fowl. *Am. J. Physiol.* 256, F639-F645, 1989.
62. Brenner, D., Gerstberger, R., Functional receptors in the avian kidney for C-type natriuretic peptide. *Endocrinology.* 140, 1622-1629, 1999.
63. Breton, S., Brown, D., Cold-induced microtubule disruption and relocation of membrane proteins in kidney epithelial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9, 155-166, 1998.
64. Breyer, MD., Breyer, RM., Prostaglandin E receptors and the kidney. *Am. J. Physiol.* 279, F12-F23, 2000.
65. Brokl, OH., Braun, EJ., Dantzler, WH., Transport of PAH, urate, TEA and fluid by isolated perfused and nonperfused avian renal proximal tubules. *Am. J. Physiol.* 266, R1085-R1094, 1994.
66. Brown, EM., Gamba, G., Riccardi, D., Lombardi, M., Butters, R., Kifor, O., Sun, A., Hediger, MA., Lytton, J., Hebert, SC., Cloning and characterization of an extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature*, 366, 575-580, 1993.
67. Brown, D., The ins and outs of aquaporin-2 trafficking. *Am. J. Physiol.* 284, F893-F901, 2003.
68. Brown, D., Breton, S., Ausiello, DA., Marskansky, V., Sensing, signalling and sorting events in kidney epithelial cell physiology. *Traffic* 10, 275-284, 2009.

69. Brown, D., Grosso, A., DeSousa, RC., Correlation between water flow and intramembrane particle aggregates in toad epidermis. *Am. J. Physiol.* 245, 334-342, 1983.
70. Brown, D., Orci, L., Vasopressin stimulates formation of coated pits in rat kidney collecting ducts. *Nature (London)* 302, 253-255, 1983.
71. Brown, D., Stow, JL., Protein trafficking and polarity in kidney epithelium: from cell biology. *Physiol. Rev.* 76, 245-297, 1996.
72. Brown, D., Weyer, P., Orci, L., Vasopressin stimulates endocytosis in kidney collecting duct principal cells. *Eur. J. Cell. Biol.* 46, 336-341, 1988.
73. Brown, EM., Pollak, M., Hebert, SC., Sensing of extracellular Ca<sup>2+</sup> by parathyroid and kidney cells: cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor. *Am. J. Kidney Dis.* 25, 506-513, 1995.
74. Brummermann, M., Braun, EJ., Renal response of roosters with diabetes insipidus to infusions of arginine vasotocin. *Am. J. Physiol.* 269, R57-R63, 1995.
75. Brummermann, M., Simon, E., Arterial hypotension in ducks adapted to high salt intake. *J. Comp. Physiol. B.* 160, 127-136, 1990.
76. Brunger, AT., Weninger, K., Bowen, M., Chu, S., Single molecule studies of the neuronal SNARE fusion machinery. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 903-928, 2009.
77. Burbach, JPH., Adan, RAH., Lolait, SJ., van Leeuwen, FW., Mezey, E., Palcovits, M., Barberis, C., Molecular neurobiology and pharmacology of the vasopressin/oxytocin receptor family. *Cell. Mol. Neurobiol.* 15, 573-595, 1995.
78. Burgess, WW., Harvey, AM., Marshall Jr., EK., The site of the antidiuretic action of pituitary extract. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 49, 237-249, 1933.
79. Burgoyne, RD., Morgan, A., Ca<sup>2+</sup> and secretory vesicle dynamics. *Trends Neurosci.* 18, 191-196, 1995.
80. Campbell, FE., Bredhauer, B., Trauma-induced central diabetes insipidus in a cat. *Austr. Vet. J.* 83, 732-735, 2005.
81. Carsia, RV., Weber, H., Dietary protein restriction stress in the domestic chicken (*Gallus gallus domesticus*) induces remodeling of adrenal steroidogenic tissue that supports hyperfunction. *Gen. Comp. Endocrinol.* 120, 99-107, 2000.
82. Casotti, G., Braun, EJ., Functional morphology of the glomerular filtration barrier of *Gallus gallus*. *J. Morphol.* 228, 327-334, 1996.
83. Casotti, G., Waldron, T., Misquith, G., Powers, D., Slusher, L., Expression and localization of an aquaporin-1 homologue in the avian kidney and lower intestinal tract. *Comp. Biochem. Physiol.* 147, 355-362, 2007.
84. Chan, MY., Holmes, WN., Studies on a "renin-angiotensin" system in the normal and hypophysectomized pigeon (*Columba livia*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 2, 304-311, 1971.
85. Charest-Boule', L., Mehdi, AZ., Sandor, T., Corticosteroid receptor in the avian kidney. *Steroids* 32, 109-126, 1978.
86. Chaturvedi, CM., Chowdhary, A., Wall, PT., Koike, TI., Cornett, LE., A sexual dimorphism in hypothalamic arginine vasotocin (AVT) gene expression and AVT plasma levels in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) in response to water deprivation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 117, 129-137, 2000.

87. Chaturvedi, CM., Newton, BW., Cornett, LE., Koike, TI., An *in situ* hybridization and immunohistochemical study of vasotocin neurons in the hypothalamus of water-deprived chickens. *Peptides* 15, 1179-1187, 1994.
88. Chauvet, J., Hurpet, D., Colne, T., Michel, G., Chauvet, MT., Acher, R., Neurohypophyseal hormones as evolutionary tracers: identification of oxytocin, lysine vasopressin and arginine vasopressin in two south american opossums (*Didelphis marsupialis* and *Philander opossum*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 57, 320-328, 1985.
89. Cheng, YC., Prusoff, WH., Relationship between the inhibition constant ( $K_i$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* 22, 3099-3108, 1973.
90. Chevalier, J., Ripoche, P., Pisam, M., Bourguet, J., Hugon, JS., A time course study of water permeability and morphological alterations induced by mucosal hyperosmolarity in frog urinary bladder. *Cell. Tissue. Res.* 154, 354-356, 1974.
91. Cho, HJ., Acharjee, S., Moon, MJ., Oh, DY., Vaudry, H., Kwon, HB., Seong, JY., Molecular evolution of neuropeptide receptors with regard to maintaining high affinity to their authentic ligands. *Gen. Comp. Endocrinol.* 153, 98-107, 2007.
92. Cho, HJ., Moon, MJ., Kwon, HB., Hwang, JI., Seong, JY., Extracellular loop 3 (ECL3) and ECL3-proximal transmembrane domains VI and VII of the mesotocin and vasotocin receptors confer differential ligand selectivity and signaling activity. *Gen. Comp. Endocrinol.* 156, 71-82, 2008.
93. Chou, CL., Christensen, BM., Frische, S., Vorum, H., Desai, RA., Hoffert, JD., de Lanerolle, P., Nielsen, S., Knepper, MA., Non muscle myosin II and myosin light chain kinase are downstream targets for vasopressin signaling in the renal collecting duct. *J. Biol. Chem.* 279, 49026-49035, 2004.
94. Chou, CL., Yip, KP., Michea, L., Kador, K., Ferraris, JD., Wade, JB., Knepper, M. A., Regulation of aquaporin-2 trafficking by vasopressin in the renal collecting duct. Roles of ryanodine- sensitive  $Ca^{2+}$  stores and calmodulin. *J. Biol. Chem.* 275, 36839-36846, 2000.
95. Chrispeels, MJ., Agre, P., Aquaporins: water channels proteins of plant and animal cells. *TIBS* 19, 421-425, 1994.
96. Christensen, JA., Morild I., Mikeler, E., Bohle, A., Juxtglomerular apparatus in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Kidney Int.* 22, S24-S29, 1982.
97. Christensen, BM., Wang, W., Frokiaer, J., Nielsen, S., Axial heterogeneity in basolateral AQP2 localization in rat kidney: effect of vasopressin. *Am. J. Physiol.* 284, F701-F717, 2003.
98. Christensen, BM., Zelenina, M., Aperia, A., Nielsen, S., Localization of phosphorylated aquaporin-2 (AQP2) in kidney collecting duct principal cells in response to dDAVP or V2 receptor antagonist treatment. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9, 16a, 1998.
99. Chu, SHW., Nesheim, MC., The relationship of plasma arginine and kidney arginase activity to arginine degradation in chickens. *J. Nutr.* 109, 1752-1758, 1979.
100. Coffin, VL., Spealman, RD., Psychomotor-stimulant effects of 3-isobutyl-1-methylxanthine: a comparison with caffeine and 7-(2-chloroethyl) theophylline. *Eur. J. Pharmacol.* 170, 35-40, 1989.

101. Coleman, RA., Wu, DC., Liu, J., Expression of aquaporins in the renal connecting tubule. *Am. J. Physiol.* 279, F874-F883, 2000.
102. Colledge, M., Scott, J. D., AKAPs: from structure to function. *Trends Cell. Biol.* 9, 216-221, 1999.
103. Collie, MA., Holmes, WN., Cronshaw, J., A comparison of the responses of dispersed steroidogenic cells derived from embryonic adrenal tissue from the domestic chicken (*Gallus domesticus*), the domestic Pekin duck and the wild mallard duck (*Anas platyrhynchos*) and the domestic muscovy duck (*Cairina moschata*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 88, 375-387, 1992.
104. Coon, C., Balling, R., Asparagine and glutamine metabolism in chicks. *Poult. Sci.* 63, 717-729, 1984.
105. Coons, AH., Fluorescent antibody methods. *Gen. Cytochem. Methods.* 1, 399-422, 1958.
106. Cornett, LE., Kirby, JD., Vizcarra, JA., Ellison, JC., Thrash, J., Mayeux, PR., Crew, MD., Jones, SM., Ali, N., Baeyens, DA., Molecular cloning and functional characterization of a vasotocin receptor subtype expressed in the pituitary gland of the domestic chicken (*Gallus domesticus*): avian homolog of the mammalian V1b-vasopressin receptor. *Regul. Pept.* 110, 231-239, 2003.
107. Cowan, SW., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Pauptit, RA., Jansonius, JN., Rosenbusch, JP., Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature.* 358, 727-733, 1992.
108. Cowen, BS., Wideman, RF. Jr., Rothenbacher, H., Braune, MO., An outbreak of avian urolithiasis on a large commercial egg farm. *Avian Dis.* 31, 392-397, 1987.
109. Cox, JV., Moon, RT., Lazarides, E., Anion transporter: highly cell-type specific expression of distinct polypeptides and transcripts in erythroid and nonerythroid cells. *J. Cell Biol.* 100, 1548-1557, 1985.
110. Craan, AG., Vinay, P., Lemieux, G., Gougoux, A., Metabolism and transport of L-glutamine and L-alanine by renal tubules of chickens. *Am. J. Physiol.* 245, F142-F150, 1983.
111. Cree, A., Effects of arginine vasotocin on water balance of three leiopelmatid frogs. *Gen. Comp. Endocrinol.* 72, 340-350, 1988.
112. Cutler, C. P., Cramb, G., Water transport and aquaporin expression in fish. In: *Molecular Biology and Physiology of Water and Solute Transport.* (Eds: Hohmann, S. and Nielsen, S.), Academic Press, New York, 433-441, 2000.
113. Cuypers, Y., McConaghey, P., Steels, P., The direct renal tubular effect of angiotensin II in chicken. *Ren. Physiol. Biochem.* 16, 325-332, 1993.
114. Daly, JW., Forskolin, adenylate cyclase, and cell physiology: an overview. *Adv. Cyclic Nucleot. Prot. Phosphoryl. Res.* 17, 81-89, 1984.
115. Dantzler, WH., Renal response of chicken to infusion of hyperosmotic NaCl solution. *Am. J. Physiol.* 210, 640-646, 1966.
116. Dantzler, WH., Glomerular and tubular effects of arginine vasotocin in water snakes (*Natrix sipedon*). *Am. J. Physiol.* 212, 83-91, 1967.
117. Dantzler, WH., Some renal glomerular and tubular mechanisms involved in osmotic and volume regulation in reptiles and birds. In: *Osmotic and Volume*

- Regulation, Alfred Benzon Symposium XI (Eds: Jorgensen, CB., Skadhauge, E.), Munksgaard Press, Copenhagen, 187-201, 1978.
118. Dantzler, WH., Studies on nonmammalian nephrons. *Kidney Internat.* 22, 560-570, 1982.
  119. Dantzler, WH., Renal mechanisms for osmoregulation in reptiles and birds. In: *Animals and Environmental Fitness* (Ed: Gilles, R.), Pergamon Press, Oxford, 91-110, 1980a.
  120. Dantzler, WH., Significance of comparative studies for renal physiology. *Am. J. Physiol.* 238, F437-F444, 1980b.
  121. Dantzler, WA., Braun, EJ., Comparative nephron function in reptiles, birds and mammals. *Am. J. Physiol.* 239, R197-R213, 1980.
  122. De Jesus Ferreira, MC., Bailly, C., Extracellular  $Ca^{2+}$  decreases chloride reabsorption in rat CTAL by inhibiting cAMP pathway. *Am. J. Physiol.* 275, F198-F203, 1998.
  123. De Sousa, RC., Grosso, A., Vanadate blocks cyclic AMP-induced stimulation of sodium and water transport in amphibian epithelia. *Nature.* 279, 803-804, 1979.
  124. Deen, PM., Knoers, NV., Physiology and pathophysiology of the aquaporin-2 water channel. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 7, 37-42, 1998.
  125. Deen, PM., Rijss, JP., Mulders, SM., Errington, RJ., van Baal, J., van Os, CH., Aquaporin-2 transfection of Madin-Darby canine kidney cells reconstitutes vasopressin-regulated transcellular osmotic water transport. *J. Am. Soc. Nephrol.* 8, 1493-1501, 1997.
  126. Deen, PM., van Balkom, BW., Kamsteeg, EJ., Routing of the Aquaporin-2 water channel in health and disease. *Eur. J. Cell. Biol.* 79, 523-530, 2000.
  127. Denker, BM., Smith, BL., Kuhajda, FD., Agre, P., Identification, purification and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membran protein from erythrocytes and renal tubules. *J. Biol. Chem.* 263, 15634-15642, 1988.
  128. Detmers, FJM., de Groot, BL., Müller, EM., Hinton, A., Konings, IBM., Quaternary ammonium compounds as water channel blockers. *J. Biol. Chem.* 281, 14207-14214, 2006.
  129. Dibas, AI., Mia, AJ., Yorio, T., Aquaporins (water channels): role in vasopressin-activated water transport. *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.* 219, 183-199, 1998.
  130. DiGiovanni SR., Nielsen, S., Christensen, EI., Knepper, MA., Regulation of collecting duct water channel expression by vasopressin in brattleboro rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 8984-8988, 1994.
  131. Dousa, TP., Effects of hormones on cyclic AMP formation in kidneys of nonmammalian vertebrates. *Am. J. Physiol.* 226, 1193-1197, 1974.
  132. Drenckhahn, D., Schlüter, K., Allen, DP., Benett, V., Colocalization of band 3 with ankyrin and spectrin at the basal membran of intercalated cells in the rat kidney. *Science*, 230, 1287-1289, 1985.
  133. Dröbber, K., Gemsa, D., Wörterbuch der Immunologie. Spektrum akademischer Verlag Gustav Fischer. 2000.

134. Dudas, PL., Pelis, RM., Braun, EJ., Renfro, JL., Transepithelial urate transport by avian renal proximal tubule epithelium in primary culture. *J. Exp. Biol.* 208, 4305-4315, 2005.
135. Dudel, J., Adelsberger, H., Heckmann, M., Neuromuscular glutamatergic and GABAergic channels. *Invert. Neurosci.* 3, 89-92, 1997.
136. Ecelbarger, CA., Chou, CL., Lolait, SJ., Knepper, MA., DiGiovanni, SR., Evidence for dual signaling pathways for V2 vasopressin receptor in rat inner medullary collecting duct. *Am. J. Physiol.* 270, 623-633, 1996.
137. Echevarria, M., Windhager, EE., Tate, SS., Frindt, G., Cloning and expression of AQP3, a water channel from the medullary collecting duct of rat kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 10997-11001, 1994.
138. Edwards, JG., The vascular pole of the glomerulus in the kidney of vertebrates. *Anat. Rec.* 76, 382-389, 1940.
139. Elalouf, JM., Roinel, N., De Rouffignac, C., Effects of antidiuretic hormone on electrolyte reabsorption and secretion in distal tubules of rat kidney. *Pflügers. Arch. Eur. J. Physiol.* 401, 167-173, 1984.
140. Evered, MD., Fitzsimons, JT., Drinking and changes in blood pressure in response to angiotensin II in the pigeon *Columbia livia*. *J. Physiol. (Lond.)* 310, 337-352, 1981.
141. Fenton, RA., Brond, L., Nielsen, S., Praetorius, J., Cellular and subcellular distribution of the type-2 vasopressin receptor in the kidney. *Am. J. Physiol.* 293, F748-F760, 2007.
142. Fischbarg, J., Li, J., Cheung, M., Czegledy, F., Iserovich, P., Kuang, K., Predictive evidence for a porin-type beta-barrel fold in CHIP28 and other members of the MIP family. A restricted pore model common to water channels and facilitators. *J. Membr. Biol.* 143, 177-188, 1995.
143. Fitzsimons, JT., Angiotensin, thirst and sodium appetite. *Physiol. Rev.* 78, 583-686, 1998.
144. Ford, SS., Bradshaw, SD., Kidney function and the role of arginine vasotocin in three agamid lizards from habitats of differing aridity in western australia. *Gen. Comp. Endocrinol.* 147, 62-69, 2006.
145. Franki, N., Macaluso, F., Gao, Y., Hays, R. M., Vesicle fusion proteins in rat inner medullary collecting duct and amphibian bladder. *Am. J. Physiol.* 268, C792-C797, 1995.
146. Frey, KA., Albin, RL., Receptor binding techniques. *Curr. Protoc. Neurosci.* Chapter 1, Unit 1.4, 2001.
147. Fushimi, K., Sasaki, S., Marumo, F., Phosphorylation of serine 256 is required for cAMP-dependent regulatory exocytosis of the aquaporin-2 water channel. *J. Biol. Chem.* 272, 14800-14804, 1997.
148. Fushimi, K., Sasaki, S., Yamamoto, T., Hayashi, M., Furukawa, T., Uchida, S., Kuwahara, M., Ishibashi, K., Kawasaki, M., Kihara, I., Marumo, F., Functional characterization and cell immunolocalization of AQP-CD water channel in kidney collecting duct. *Am. J. Physiol.* 267, F573-F582, 1994.

149. Fushimi, K., Uchida, S., Hara, YF., Hirata, Y., Marumo, F., Sasaki, S., Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature* 361, 549-552, 1993.
150. Fujimoto, JM., Lech, JJ., Zamiatowski, R., A site of action of novobiocin in inhibiting renal tubular transport of drugs in the chicken. *Biochem. Pharmacol.* 22, 971-979, 1973.
151. Gabrielli, MG., Materazzi, G., Menghi, G., The metanephros of the quail embryo. Developmental expression of carbonic anhydrase investigated by multiple approaches. *J. Anat.* 196, 31-40, 2000.
152. Gabrielli, G., Vincenzetti, S., Vita, A., Menghi, G., Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isoenzymes II and III in quail kidney. *J. Histochemistry* 30, 489-497, 1998.
153. Gaeggeler, HP., Gonzalez-Rodriguez, E., Jaeger, NF., Loffing-Cueni, D., Norregaard, R., Loffing, J., Horisberger, JD., Rossier, BC., Mineralocorticoid versus glucocorticoid receptor occupancy mediating aldosterone-stimulated sodium transport in a novel renal cell line. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 878-891, 2005.
154. Gemmell, RT., Sernia, C., Immunocytochemical location of oxytocin and mesotocin within the hypothalamus of two australian marsupials, the bandicoot isoodon macrourus and the brushtail possum trichosurus vulpecula. *Gen. Comp. Endocrinol.* 75, 96-102, 1989.
155. Gerstberger, R., Zentralnervöse Kontrollmechanismen im Salz- und Wasserhaushalt der Pekingente (*Anas platyrhynchos*). Diss. Biologie, Stuttgart-Hohenheim, 1983.
156. Gerstberger, R., Partial uncoupling of salt gland blood flow and secretion in the Pekin duck (*Anas platyrhynchos*). *J. Physiol.* 435, 175-186, 1991.
157. Gerstberger, R., Arginine vasotocin (AVT) controls renal sodium and water excretion in birds through interaction with a new ADH receptor subtype. In: *Ionic Regulation in Animals*, (Eds: Hazon, N., Eddy, FB., Flik, G.), Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 165-184, 1997.
158. Gerstberger, R., Bender, R., Jurzak, M., Keil, R., Küchenmeister, I., Schütz, H., Modulation of avian renal salt and water elimination by arginine vasotocin, mesotocin and ADH receptor subtype-specific analogues. In: *Integrative and Cellular Aspects of Autonomic Functions: Temperature and Osmoregulation* (Eds: Pleschka, K., Gerstberger, R.), John Libbey Eurotext, Paris, 533-542, 1994.
159. Gerstberger, R., Gray, DA., Fine structure, innervation and functional control of avian salt glands. *Int. Rev. Cytol.* 144, 129-215, 1993.
160. Gerstberger, R., Gray, DA., Simon, E., Circulatory and osmoregulatory effects of angiotensin II perfusion of the third ventricle in a bird with salt glands. *J. Physiol. London.* 349, 167-182, 1984a.
161. Gerstberger, R., Fahrenholz, F., Autoradiographic localization of V1 vasopressin binding sites in rat brain and kidney. *Europ. J. Pharmacol.* 167, 105-116, 1989.
162. Gerstberger, R., Healy, DP., Hammel, HT., Simon, E., Autoradiographic localization and characterization of circumventricular angiotensin II receptors in duck brain. *Brain. Res.* 1, 165-170, 1987.

163. Gerstberger, R., Kaul, R., Gray, DA., Simon, E., Arginine vasotocin and glomerular filtration rate in saltwater-acclimated ducks. *Am. J. Physiol.* 248, F663-F667, 1985.
164. Gerstberger, R., Müller, AR., Hübschle, T., Hypothalamic control of osmoregulation. In: *Perspectives in Avian Endocrinology* (Eds: Etches, R., Harvey, S.), The Endocrine Society Press, England. 289-303, 1997.
165. Gerstberger, R., Simon, E., Gray, DA., Salt gland and kidney responses to intracerebral osmotic stimulation in salt- and water-loaded ducks. *Am. J. Physiol.* 247, R1022-R1028, 1984b.
166. Ghirardello, S., Malattia, C., Scagnelli, P., Maghnie, M., Current perspective on the pathogenesis of central diabetes insipidus. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 18, 631-645, 2005.
167. Giladi, I., Goldstein, DL., Pinshow, B., Gerstberger, R., Renal function and plasma levels of arginine vasotocin during free flight in pigeons. *J. Exp. Biol.* 200, 3203-3211, 1997.
168. Glahn, RP., Bottje, WG., Maynard, P., Wideman, RF. JR., Response of the avian kidney to acute changes in arterial perfusion pressure and portal blood supply. *Am. J. Physiol.* 264, R428-R434, 1993.
169. Goecke, C., Goldstein, DL., Renal glomerular and tubular effects of antidiuretic hormone and two antidiuretic hormone analogues in house sparrows (*Passer domesticus*). *Physiol. Zool.* 3, 283-291, 1997.
170. Goldstein, DL., Effects of water restriction during growth and adulthood on renal function in bobwhite quail. *J. Comp. Physiol.* 164, 663-670, 1995.
171. Goldstein, DL., Regulation of the avian kidney by arginine vasotocin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 147, 78-84, 2006.
172. Goldstein, DL., Bradshaw, SD., Renal function in red wattlebirds in response to varying fluid intake. *J. Comp. Physiol. B* 168, 265-272, 1998.
173. Goldstein, DL., Braun, EJ., Contribution of the kidneys and intestines to water conservation, and plasma levels of antidiuretic hormone, during dehydration in house sparrows (*Passer domesticus*). *J. Comp. Physiol. B.* 158, 353-361, 1988.
174. Goldstein, DL., Braun, EJ., Structure and concentrating ability in the avian kidney. *Am. J. Physiol.* 256, R501-R509, 1989.
175. Goldstein, DL., Reddy, V., Plaga, K., Second messenger production in avian medullary nephron segments in response to peptide hormones. *Am. J. Physiol.* 276, R847-R854, 1999.
176. Goldstein, DL., Skadhauge, E., Renal and extrarenal regulation of body fluid composition. In: *Avian Physiology*, 5th edition, chapter 11 (Ed: Sturkie, PD), Springer Press New York, 265-291, 2000.
177. Gonen, T., Walz, T., The structure of aquaporins. *Q. Rev. Biophys.* 39, 361-396, 2006.
178. Gorbulev, V., Büchner, H., Akhundova, A., Fahrenholz, F., Molecular cloning and functional characterization of V<sub>2</sub> [8-lysine] vasopressin and oxytocin receptors from a pig kidney cell line. *Eur. J. Biochem.* 215, 1-7, 1993.

179. Goren, O., Adorjan, I., Kalman, M., Heterogeneous occurrence of Aquaporin-4 in the ependyma and in the circumventricular organs in rat and chicken. *Anat. Embryol.* 211, 155-172, 2006.
180. Goto, K., Koike, T., Neldon, H., McKay, D.W., Peripheral angiotensin II stimulates release of vasotocin in conscious chicken. *Am. J. Physiol.* 25, R333-R340, 1986.
181. Gouraud, S., Laera, A., Calamita, G., Carosino, M., Procino, G., Rossetto, O., Mannucci, R., Rosenthal, W., Svelto, M., Valenti, G., Functional involvement of VAMP/synaptobrevin-2 in cAMP-stimulated aquaporin 2 translocation in renal collecting duct cells. *J. Cell. Sci.* 115, 3667-3674, 2002.
182. Grantham, J.J., Burg, M.B., Effect of vasopressin and cyclic AMP on permeability of isolated collecting tubules. *Am. J. Physiol.* 211, 255-259, 1966.
183. Gray, D.A., Plasma atrial natriuretic factor concentrations and renal actions in the domestic fowl. *J. Comp. Physiol. B* 163, 519-523, 1993.
184. Gray, D.A., Erasmus, T., Glomerular filtration changes during vasotocin-induced antidiuresis in kelp gulls. *Am. J. Physiol.* 255, R936-R939, 1988a.
185. Gray, D.A., Erasmus, T., Plasma arginine vasotocin and angiotensin II in the water deprived kelp gull (*Larus dominicanus*), cape gannet (*Sula capensis*) and Jackass penguin (*Spheniscus demersus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 91A, 727-731, 1988b.
186. Gray, D.A., Erasmus, T., Control of renal and extrarenal salt and water excretion by plasma angiotensin II in the kelp gull (*Larus dominicanus*). *J. Comp. Physiol. B* 158, 651-660, 1989.
187. Gray, D.A., Gerstberger, R., Simon, E., Role of angiotensin II in aldosterone regulation in the Pekin duck. *J. Endocrinol.* 123, 445-452, 1989.
188. Gray, D.A., Maloney, S.K., Antidiuretic hormone and angiotensin II plasma concentrations in febrile pekin ducks. *J. Physiol.* 511, 605-610, 1998.
189. Gray, D.A., Schütz, H., Gerstberger, R., Interaction of atrial natriuretic factor and osmoregulatory hormones in the pekin duck. *Gen. Comp. Endocrinol.* 81, 246-255, 1991a.
190. Gray, D.A., Schütz, H., Gerstberger, R., Plasma atrial natriuretic factor responses to blood volume changes in the Pekin duck. *Endocrinology.* 128, 1655-1660, 1991b.
191. Gray, D.A., Simon, E., Mammalian and avian antidiuretic hormone: studies related to possible species variation in osmoregulatory systems. *J. Comp. Physiol.* 151, 241-246, 1983.
192. Gray, D.A., Simon, E., Control of plasma angiotensin II in a bird with salt glands (*Anas platyrhynchos*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 60, 1-13, 1985.
193. Gray, D.A., Simon, E., Dehydration and arginine vasotocin and angiotensin II in CSF and plasma of Pekin ducks. *Am. J. Physiol.* 253, R285-R291, 1987.
194. Gregg, C.M., Widemann, R.F. Jr., Effects of atriopeptin and chicken heart extract in *Gallus domesticus*. *Am. J. Physiol.* 251, R543-R551, 1986.
195. Gregg, C.M., Wideman, R.F. Jr., Morphological and functional comparisons of normal and hypertrophied kidneys of adult domestic fowl (*Gallus gallus*). *Am. J. Physiol.* 258, F403-F413, 1990.

196. Grossmann, R., Ellendorff, F., Functional development of the prenatal brain. II. Ontogeny of the hypothalamo-neurohypophysial axis in the pre- and perinatal chicken brain. *Exp. Brain. Res.* 62, 642-647, 1986.
197. Grünbaum, E., Moritz, A., The diagnosis of nephrogenic diabetes insipidus in the dog. *Tierärztliche Praxis* 19, 539-544, 1991.
198. Gubrij, KI., Chaturvedi, CM., Ali, N., Cornett, LE., Kirby, JD., Wilkerson, J., Mikhailova, M., Turner, ML., Baeyens, DA., Molecular cloning of an oxytocin-like receptor expressed in the chicken shell gland. *Comp. Biochem. Physiol. B* 142, 37-45, 2005.
199. Guibbolini, ME., Lahlou, B., G-I protein mediates adenylate cyclase inhibition by neurohypophyseal hormones in fish gill. *Peptides* 13: 865-871, 1992.
200. Gwee, PC., Amemiya, CT., Brenner, S., Venkatesh, B., Sequence and organization of coelacanth neurohypophysial hormone genes: evolutionary history of the vertebrate neurohypophysial hormone gene locus. *BMC. Evol. Biol.* 26, 8:93, 2008.
201. Hamann, D., Hunt, N., Ivell, R., The chicken vasotocin gene. *J. Neuroendocrin.* 4, 505-513, 1992.
202. Han, JS., Maeda, Y., Knepper, MA., Dual actions of vasopressin and oxytocin in regulation of water permeability in terminal collecting duct. *Am. J. Physiol.* 265, F26-F34, 1993.
203. Handa, RK., Handa, SE., Elgemark, MK., Autoradiographic analysis and regulation of angiotensin receptor subtypes AT(4), AT(1) and AT(1-7) in the kidney. *Am. J. Physiol.* 281, F936-F947, 2001.
204. Hara-Chikuma, M., Verkman, AS., Physiological roles of glycerol-transporting aquaporins: the aquaglyceroporins. *Cell. Mol. Life. Sci.* 63, 1386-1392, 2006.
205. Harb, MF., Nelson, RW., Feldman, EC., Scott-Moncrieff, JC., Griffey, SM., Diabetes insipidus in dogs: 20 cases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 209, 1884-1888, 1996.
206. Harlow, E., Lane, D., *Antibodies- A laboratory manual.* Cold Spring Harbour Laboratory. 1988.
207. Harré, EM., Roth, J., Gerstberger, R., Hübschle, T., Interleukin-6 mediates lipopolysaccharide-induced nuclear STAT3 translocation in astrocytes of rat sensory circumventricular organs. *Brain. Res.* 980, 151-155, 2003.
208. Hasegawa, T., Suzuki, M., Tanaka, S., Immunocytochemical studies on translocation of phosphorylated AQP-h2 protein in granular cells of the frog urinary bladder before and after stimulation with vasotocin. *Cell Tissue. Res.* 322, 407-415, 2005.
209. Hasegawa, T., Tanii, H., Suzuki, M., Tanaka, S., Regulation of water absorption in the frog skins by two vasotocin dependent water channel aquaporins, AQP-h2 and AQP-h3. *Endocrinol.* 144, 4087-4096, 2003.
210. Hasler, U., Controlled aquaporin-2 expression in the hypertonic environment. *Am. J. Physiol.* 296, C641-C653, 2009.
211. Hasler, U., Mordasini, D., Bens, M., Bianchi, M., Cluzeaud, F., Rousselot, M., Vandewalle, A., Feraille, E., Martin, PY., Long term regulation of aquaporin-2

- expression in vasopressin-responsive renal collecting duct principle cells. *J. Biol. Chem.* 277, 10379-10386, 2002.
212. Hasler, U., Nunes, P., Bouley, R., Matsuzaki, T., Brown, D., Acute hypertonicity alters aquaporin-2 trafficking and induces a MAP kinase-dependent accumulation at the plasma membrane of renal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 283, 26643-26661, 2008.
  213. Hayashi, M., Sasaki, S., Tsuganezawa, H., Monkawa, T., Kitajima, W., Konishi, K., Fushimi, K., Marumo, F., Saruta, T., Expression and distribution of aquaporin of collecting duct are regulated by vasopressin V2 receptor in rat kidney. *J. Clin. Invest.* 94, 1778-1783, 1994.
  214. Hays, RM., Chevalier, J., Gobin, R., Bourguet, J., Fusion images and intramembrane particle aggregates during the action of antidiuretic hormone. A rapid-freeze study. *Cell. Tissue. Res.* 240, 433-439, 1985.
  215. Hebert, SC., Andreoli, TE., The effects of ADH on salt and water transport in the mammalian nephron: the collecting duct and thick ascending limb of henle. In: *Membrane transport processes in organized systems.* New York. Plenum. 317-327, 1986.
  216. Hebert, SC., Brown, EM., Harris, HW., Role of the Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor in divalent mineral ion homeostasis. *J. Exp. Biol.* 200, 295-302, 1997.
  217. Hedin, L., Rosberg, S., Forskolin effects on the cAMP system and steroidogenesis in the immature rat ovary. *Mol. Cell. Endocrinol.* 33, 69-80, 1983.
  218. Heinz, MK., Gray, DA., Role of plasma ANG II in the excretion of acute sodium load in a bird with salt glands (*Anas platyrhynchos*). *Am. J. Physiol.* 281, R346-R351, 2001.
  219. Hendriks, G., Koidijs, M., van Balkom, BWM., Ooschot, V., Klumpermann, J., Deen, PMT., van der Sluijs, P., Glycosylation is important for the cell surface expression of the water channel aquaporin-2 but is not essential for the tetramerization in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 279, 2975-2983, 2004.
  220. Henn, V., Stefan, E., Baillie, GS., Houslay, MD., Rosenthal, W., Klussmann, E., Compartmentalized cAMP signalling regulates vasopressin-mediated water reabsorption by controlling aquaporin-2. *Biochem. Soc. Transactions* 33, 1316-1318, 2005.
  221. Hentschel, H., Elger, M., Morphology of glomerular and aglomerular kidneys. In "Structure and function of the kidney" (RKH. Kinne, Ed.), Karger Basel, 1-72, 1989.
  222. Hernando, F., Schoots, O., Lolait, SJ., Peter, J., Burbach, H., Immunohistochemical localization of the vasopressin V1b receptor in the rat brain and pituitary gland: anatomical support for its involvement in the central effects of vasopressin. *Endocrinol.* 142, 1659-1668, 2001.
  223. Hinshaw, JE., Dynamin and its role in membrane fission. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 16, 483-519, 2000.
  224. Hofer, AM., Brown, EM., Extracellular calcium sensing and signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4, 530-538, 2003.

225. Hoffert, J.D., Chou, C.-L., Fenton, R.A., Knepper, M.A., Calmoculin is required for vasopressin-stimulated increase in cyclic AMP production in inner medullary collecting duct. *J. Biol. Chem.* 14, 13624-13630, 2005.
226. Holmes, WN., Fletcher, GL., Stewart, DJ., The patterns of renal electrolyte excretion in the duck (*Anas Platyrhynchos*) maintained on freshwater and on hypertonic saline. *J. Exp. Biol.* 48, 487-508, 1968.
227. Holz, GG., Kang, G., Harbeck, M., Roe, MW., Chepurny, OG., Cell Physiology of cAMP sensor Epac. *J. Physiol.* 577, 5-15, 2006.
228. Houslay, MD., Adams, DR., PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochem.* 370, 1-18, 2003.
229. Houweling, AC., Somi, S., Massink, MPG., Groenen, MA., Moorman, AFM., Christoffels, VM., Comparative analysis of the natriuretic peptide precursor gene cluster in vertebrates reveals loss of ANF and retention of CNP-3 chicken. *Develop. Dyn.* 233, 1076-1082, 2005.
230. Hozawa, IS., Holtzman, EJ., Ausiello, DA., cAMP motifs regulating transcription in the aquaporin 2 gene. *Am. J. Physiol.* 270, C1695-C1702, 1996.
231. Huber, GC., On the morphology of the renal tubules of vertebrates. *Anat. Rec.* 13, 305-339, 1917.
232. Hübschle, T., Thom, E., Watson, A., Roth, J., Klaus, S., Meyerhof, W., Leptin-induced nuclear translocation of STAT3 immunoreactivity in hypothalamic nuclei involved in body weight regulation. *J. Neurosci.* 21, 2413-2424, 2001.
233. Hughes, MR., Relative kidney size in nonpasserine birds with functional salt glands. *Condor.* 72, 164-168, 1970.
234. Hughes, MR., Glomerular filtration rate in saline acclimated ducks, gulls and gees. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 65, 211, 1980.
235. Hughes, MR., Roberts, JR., Thomas, BR., Renal function in freshwater and chronically saline-stressed male and female Pekin ducks. *Poult. Sci.* 68, 408-416, 1989.
236. Inoue, T., Nielsen, S., Mandon, B., Terris, J., Kishore, BK., Knepper, MA., SNAP-23 in rat kidney: colocalization with aquaporin-2 in collecting duct vesicles. *Am. J. Physiol.* 275, F752-F760, 1998.
237. Inoue, T., Nomoguchi, H., Tomita, K., Physiological effects of vasopressin and atrial natriuretic peptide in the collecting duct. *Cardiovasc. Res.* 51, 470-480, 2001.
238. Ishibashi, K., Imai, M., Sasaki, S., Cellular localization of aquaporin 7 in the rat kidney. *Exp. Nephrol.* 8, 252-257, 2000.
239. Ishibashi, K., Sasaki, S., Fushimi, K., Uchida, S., Kuwahara, M., Saito, H., Furukawa, T., Nakajima, K., Yamaguchi, Y., Gojobori, T., Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 6269-6273, 1994.
240. Isokpehi, RH., Rajnarayanan, RV., Jeffries, CD., Oyeleye, TO., Cohly, HH., Integrative sequenz and tissue expression of chicken and mammalian aquaporins. *BMC. Genomics.* 10, 2-7, 2009.

241. Ivell, R., Richter, D., Structure and comparison of the oxytocin and vasopressin genes from rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81, 2006-2010, 1984.
242. Izumi, Y., Nakayama, Y., Mori, T., Miyazaki, H., Inoue, H., Kohda, Y., Inoue, T., Nonoguchi, H., Tomita, K., Downregulation of vasopressin V<sub>2</sub> receptor promoter activity via V<sub>1a</sub> receptor pathway. *Am. J. Physiol.* 292, F1418-F1426, 2007.
243. Jaccoby, S., Singh, AB., Cornett, LE., Koike, TI., Arginine vasotocin gene expression and secretion during osmotic stimulation and hemorrhagic hypotension in hens. *Gen. Comp. Endocrinol.* 106, 327-337, 1997.
244. Jaccoby, S., Koike, TI, Cornett, LE., c-fos expression in the forebrain and brainstem of White Leghorn hens following osmotic and cardiovascular challenges. *Cell Tissue Res.* 297, 229-239, 1999.
245. Janeway, CA., Travers, P., Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford. 1997.
246. Janeway, CA., Travers, P., Walport, M., Capra, JD., Immunobiology. Elsevier Science Ltd/ Garland Publishing. 1999.
247. Jang, KJ., Cho, HS., Kang, DH., Bae, WG., Kwon, TH., Suh, KY., Fluid-shear-induced translocation of aquaporin-2 and reorganization of actin cytoskeleton in renal tubular epithelial cells. *Integr. Biol.* 3, 134-141, 2011.
248. Jans, DA., Peters, R., Zsigo, J., Fahrenholz, F., The adenylate cyclase-coupled vasopressin V<sub>2</sub>-receptor is highly laterally mobile in membranes of LLC-PK<sub>1</sub> renal epithelial cells at physiological temperatur. *EMBO J.* 8, 2481-2488, 1989.
249. Jarausch, KH., Ullrich, KJ., Studies on the problem of urine concentration and dilution; distribution of electrolytes (sodium, potassium, calcium, magnesium, anorganic phosphate), urea amino acids and exogenous creatinine in the cortex and medulla of dog kidney in various diuretic conditions. *Pflügers. Arch. - Eur. J. Physiol.* 262, 537-550, 1965.
250. Jard, S., Lombard, C., Marie, J., Devilliers, G., Vasopressin receptors from cultured mesangial cells resemble V<sub>1a</sub> type. *Am. J. Physiol.* 253, F41-F49, 1987.
251. Jeng, W., Mathieson, IM., Ihara, W., Ramirez, G., Aquaporin-1: an osmoinducible water channel in cultured mIMCD-3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245, 804-809, 1998a.
252. Jeng, W., Cooper, DR., Bittle, P., Ramirez, G., Aquaporin-1 expression in proximal tubule epithelial cells of human kidney is regulated by hyperosmolarity and contrast agents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246, 240-248, 1998b.
253. Jo, I., Harris, HW., Amedt-Raduege, AM., Majewski, RR., Hammond, TG., Rat kidney papilla contains abundant synaptobrevin protein that participates in the fusion of antidiuretic hormone (ADH) water channel- containing endosomes *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 92, 1876-1880, 1995.
254. Johnson, OW., Relative thickness of the renal medulla in birds. *J. Morphol.* 142, 277-284, 1974.
255. Johnson, OW., Mugaas, JN., Some histological features of avian kidneys. *Am. J. Anat.* 127, 423-436, 1970.
256. Johnson, OW., Urinary organs. In: *Form and Function in Birds* (Eds: King, AS., McLelland, J.), Academic Press. London, 183-235, 1979.

257. Johnson, OW., Phipps, GL., Mugaas, JN., Injection studies of cortical and medullary organization in the avian kidney. *J. Morphol.* 136, 181-190, 1972.
258. Jung, JS., Bath, RV., Preston, GM., Guggino, WB., Baraban, JM., Agre, P., Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 13052-13056, 1994a.
259. Jung, JS., Preston, GM., Smith, BL., Guggino, WB., Agre, P., Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. *J. Biol. Chem.* 269, 14648-14654, 1994b.
260. Jurkevich, A., Barth, SW., Grossmann, R., Sexual dimorphism of arg-vasotocin gene expressing neurons in the telencephalon and dorsal diencephalon of the domestic fowl. An immunohistochemical and in situ hybridization study. *Cell. Tissue. Res.* 287, 69-77, 1997.
261. Jurkevich, A., Bergman, LR., Cornett, LE., Kuenzel, WJ., Characterization and immunohistochemical visualization of the vasotocin VT2 receptor in the pituitary gland of the chicken, *Gallus gallus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 143, 82-91, 2005.
262. Kachadorian, WA., Coleman, RA., Wade, JB., Water permeability and particle aggregates in ADH-, cAMP-, and forskolin-treated toad bladder. *Am. J. Physiol.* 253, F120-F125, 1987.
263. Kachadorian, WA., Ellis, SJ., Müller, J., Possible roles for microtubules and microfilaments in ADH action on toad urinary bladder. *Am. J. Physiol.* 236, F14-F20, 1979.
264. Kachadorian, WA., Spring, KR., Shinowara, NL., Muller, J., Palaia, TA., DiScala, VA., Effects of serosal hypertonicity on water permeability in toad urinary bladder. *Am. J. Physiol.* 258, C871-C878, 1990.
265. Kamsteeg, EJ., Wormhoudt, TA., Rijss, JP., van Os, CH., Deen, PM., An impaired routing of wild-type aquaporin-2 after tetramerization with an aquaporin-2 mutant explains dominant nephrogenic diabetes insipidus. *EMBO J.* 9, 2394-2400, 1999.
266. Kamsteeg, EJ., Heijnen, I., van Os, CH., Deen, PM., The subcellular localization of an aquaporin-2 tetramer depends on the stoichiometry of phosphorylated and nonphosphorylated monomers. *J. Cell. Biol.* 151, 919-930, 2000.
267. Kamsteeg, EJ., Duffield, AS., Konings, IB., Spencer, J., Pagel, P., Deen, PM., Caplan, MJ., MAL decreases the internalisation of the aquaporin-2 water channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 16696-16701, 2007.
268. Kasono, K., Saito, T., Saito, T., Tamemoto, H., Yanagidate, C., Uchida, S., Kawakami, M., Sasaki, S., Ishikawa, S., Hypertonicity regulates the aquaporin-2 promoter independently of arginine vasopressin. *Nephrol. Dial. Transplant* 20, 509-515, 2005.
269. Katsura, T., Ausiello, DA., Brown, D., Direct demonstration of aquaporin-2 water channel recycling in stably transfected LLC-PK1 epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 272, F817-F822, 1996.
270. Katsura, T., Gustafson, CE., Ausiello, DA., Brown, D., Protein kinase A phosphorylation is involved in regulated exocytosis of aquaporin-2 in transfected LLC-PK1 cells. *Am. J. Physiol.* 272, F817-F822, 1997.

271. Katsura, T., Verbavatz, JM., Farinas, J. Ma, T., Ausiello, D., Brown, D., Constitutive and regulated membrane expression of aquaporin 1 and aquaporin 2 water channels in stably transfected LLC-PK1 epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 7212-7216, 1995.
272. Kaul, R., Gerstberger, R., Gray, DA., Simon, E., Altering plasma concentration of arginine vasotocin changes glomerula filtration rate in saline-adapted pekin ducks. *Physiologist* 26, A-58, 1983.
273. Keil, R., Gerstberger, R., Simon, E., Hypothalamic thermal stimulation modulates vasopressin release in hyperosmotically stimulated rabbits. *Am. J. Physiol.* 267, R1089-R1097, 1994.
274. Kempf, H., Corvol, P., Gasc, JM., Expression of the chicken angiotensin II receptor: atypical pattern compared to its mammalian homologues. *Mech. Dev.* 84, 177-180, 1999.
275. Kempf, H., Corvol, P., Angiotensin receptors in fowl. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 128, 77-88, 2001.
276. Kihlstrom, JE., Danninge, I., Neurohypophysial hormones and sexual behavior in males of the domestic fowl (*Gallus domesticus L.*) and the pigeon (*Columba livia Gmel.*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 18, 115-120, 1972.
277. King, LS., Choi, M., Fernandez, PC., Cartron, JP., Agre, P., Defective urinary-concentrating ability due to a complete deficiency of aquaporin-1. *N. Engl. J. Med.* 345, 175-179, 2001.
278. King, LS., Kozono, D., Agre, P., From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5, 687-698, 2004.
279. King, AS., McLelland, J., Anatomie der Vögel. Ulmer-Verlag, Stuttgart, 1978.
280. King, LS., Yasui, M., Agre, P., Aquaporins in health and disease. *Mol. Med. Today*, 6, 60-65, 2000.
281. Kirk, KL., Origin of ADH-induced vacuoles in rabbit cortical collecting tubule. *Am. J. Physiol.* 254, F719-F733, 1988.
282. Kirk, KL., Schäfer, JA., Water transport and osmoregulation by antidiuretic hormone in terminal nephron segments. In: *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, Second Edition (ed: Seldin, DW., Giebisch G.), New York, Raven Press, 1693-1725, 1992.
283. Kishore, BK., Mandon, B., Oza, NB., DiGiovanni, SR., Coleman, RA., Ostrowski, NL., Wade, JB., Knepper, MA., Rat renal arcade segment expresses vasopressin-regulated water channel and vasopressin V2 receptor. *J. Clin. Invest.* 97, 2763-2771, 1996.
284. Kisliuk, SM., Grossmann, R., Modulation of arginine vasotocin secretion in chicks by dehydration during embryogenesis. *J. Endocrinol.* 142, 153-160, 1994.
285. Klingbeil, CK., Corticosterone and aldosterone dose-dependent responses to ACTH and angiotensin II in the duck (*Anas platyrhynchos*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 59, 382-290, 1985.
286. Kloas, W., Hanke, W., Localisation and quantification of nonapeptide binding sites in the kidney of *Xenopus laevis*: Evidence for the existence of two different nonapeptide receptors. *Gen. Comp. Endocrin.* 85, 71-78, 1992.

287. Klusmann, E., Edemir, B., Pepperle, B., Tamma, G., Henn, V., Klauschenz, E., Hundsrucker, C., Maric, K., Rosenthal, W., Ht 31: the first protein kinase A anchoring protein to integrate protein kinase A and Rho signaling. *FEBS, Lett.* 507, 264-268, 2001a.
288. Klusmann, E., Maric, K., Rosenthal, W., The mechanisms of aquaporin control in the renal collecting duct. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 141, 33-95, 2000.
289. Klusmann, E., Maric, K., Wiesner, B., Beyermann, M., Rosenthal, W., Protein kinase A anchoring proteins are required for vasopressin- mediated translocation of aquaporin-2 into cell membranes of renal principal cells. *J. Biol. Chem.* 274, 4934-4938, 1999.
290. Klusmann, E., Tamma, G., Lorenz, D., Wiesner, B., Maric, K., Hofmann, F., Aktories, K., Valenti, G., Rosenthal, W., An inhibitory role of Rho in the vasopressin-mediated translocation of aquaporin-2 into cell membranes of renal principal cells. *J. Biol. Chem.* 276, 20451-20457, 2001b.
291. Knepper, MA., Molecular physiology of urinary concentrating mechanism: Regulation of aquaporin water channels by vasopressin. *Am. J. Physiol.* 272, F3-F12, 1997.
292. Knepper, MA., Nielsen, S., Chou, CL., DiGiovanni, SR., Mechanism of vasopressin action in the renal collecting duct. *Semin. Nephrol.* 14, 302-321, 1994.
293. Knoers, NV., Monnens, LL., Nephrogenic diabetes insipidus. *Semin. Nephrol.* 19, 344-352, 1999.
294. Kobori, H., Nangaku, M., Navar, LG., Nishiyama, A., The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol. Rev.* 59, 251-287, 2007.
295. Koike, TI., Pryor, LR., Neldon, HL., Venable, RS., Effect of water deprivation of plasma radioimmunoassayable arginine vasotocin in conscious chickens (*Gallus domesticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 33, 359-364, 1977.
296. Koike, TI., Pryor, LR., Neldon, HL., Effect of saline infusion on plasma immunoreactive vasotocin in conscious chickens (*Gallus domesticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 37, 451-458, 1979.
297. Koike, TI., Pryor, LR., Neldon, HL., Effect of hemorrhage on plasma vasotocin levels in conscious chickens. *Physiologist.* 23, 106, 1980.
298. Koike, TI., Shimada, K., Cornett, LE., Plasma levels of immunoreactive mesotocin and vasotocin during oviposition in chickens: relationship to oxytocic action of the peptides *in vitro* and peptide interaction with myometrial membrane binding sites. *Gen. Comp. Endocrinol.* 70, 119-126, 1988.
299. Köhler, A., Molekularbiologische Untersuchungen der Genexpression der Nona-peptid-Hormone Mesotocin und Arginin-Vasotocin beim Huhn. *Elib.tiho-hannover. Diss.* 2000.
300. Kon, Y., Hashimoto, Y., Kitagawa, H., Kudo, N., Morphology and quantification of juxtaglomerular cells of the chicken kidney. *Jap. J. Vet. Sci.* 46, 189-196, 1984.
301. Kondo, Y., Imai, M., Effects of glutaraldehyde fixation on renal tubular function. Preservation of vasopressin-stimulated water and urea pathways in rat papillary collecting duct. *Pflügers Arch. – Eur. J. Physiol.* 408, 479-483, 1987.

302. Kondo, Y., Morimoto, T., Nishio, T., Aslanova, UF., Nishino, M., Farajov, EI., Sugawara, N., Kumagai, N., Ohsaga, A., Maruyama, Y., Takahashi, S., Phylogenetic, ontogenetic and pathological aspects of the urine-concentrating mechanism. *Clin. Exp. Nephrol.* 10, 165-174, 2006.
303. Konno, N., Hyodo, S., Yamaguchi, Y., Kaiya, H., Miyazato, M., Matsuda, K., Uchiyama, M., African lungfish, *Protopterus annectens*, possess an arginine vasotocin receptor homologous to the tetrapod V<sub>2</sub>-type receptor. *J. Exp. Biol.* 212, 2183-93, 2009.
304. Kono, T., Nishida, M., Nishiki, Y., Seki, Y., Sato, K., Akiba, Y., Characterisation of Glukose transporter (GLUT) gene expression in broiler chickens. *Br. Poultr. Sci.* 46, 510-515, 2005.
305. Korr, IM., The osmotic function of the chicken kidney. *J. Cell. Comp. Physiol.* 13, 175-194, 1939.
306. Kotnik, P., Nielsen, J., Kwon, TH., Krzysnik, C., Frokiaer, J., Nielsen, S., Altered expression of COX-1, COX-2 and mPGES in rats with nephrogenic and central diabetes insipidus. *Am. J. Physiol.* 288, F1053-F1068, 2005.
307. Krapivinsky, G., Gordon, EA., Wickman, K., Velimirovic, B., Krapivinsky, L., Clapham, DE., The G-protein-gated atrial K<sup>+</sup> channel IKACH is a heteromultimer of two inwardly rectifying K<sup>(+)</sup>-channel proteins. *Nature.* 374, 135-141, 1995.
308. Kuhar, MJ., Lloyd, DG, Appel, N., Loats, HL., Imaging receptors by autoradiography: computer-assisted approaches. *J. Chem. Neuroanat.* 4, 319-327, 1991.
309. Kurihara, S., Yasuda, M., Comparative and topographical anatomy of the fowl. 73. Size distribution of the corpuscula renis. *Jap. J. Vet. Sci.* 35, 311-318, 1973.
310. Kurihara, S., Yasuda, M., Morphological study of the kidney in the fowl. I. Arterial system. *Jap. J. Vet. Sci.* 37, 29-47, 1975a.
311. Kurihara, S., Yasuda, M., Morphological study of the kidney in the fowl. II. Renal portal and venous systems, *Jap. J. Vet. Sci.* 37, 363-377, 1975b.
312. Kuwahara, M., Asai, T., Terada, Y., Sasaki, S., The-C-terminal tail of aquaporin-2 determines apical trafficking. *Kidney Int.* 68, 1999-2009, 2005.
313. Kuwahara, M., Iwai, K., Ooeda, T., Igarashi, T., Ogawa, E., Katsushima, Y., Shinbo, I., Uchida, S., Terada, Y., Arthus, MF., Lonergan, M., Fujiwara, TM., Bichet, DG., Marumo, F., Sasaki, S., Three families with autosomal dominant nephrogenic diabetes insipidus caused by aquaporin-2 mutations in the c-terminus. *Am. J. Hum. Genet.* 69, 738-748, 2001.
314. Kuwahara, M., Fushimi, K., Terada, Y., Bai, L., Marumo, F., Sasaki, S., cAMP-dependent phosphorylation stimulates water permeability of aquaporin-collecting duct water channel protein expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 270, 10384-10387, 1995.
315. Kwong, E., Tsai, S., Nesheim, MC., Arginine uptake by chick kidney mitochondria. *J. Nutr.* 112, 2081-2090, 1982.
316. Lamaze, C., Chuang, TH., Terlecky, LJ., Bokoch, GM., Schmidt, SL., Regulation of receptor-mediated endocytosis by Rho and Rac. *Nature*, 382, 177-179, 1996.

317. Lamaze, C., Fujimoto, LM., Yin, HL., Schmid, SL., The actin cytoskeleton is required for receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 272, 20332-20335, 1997.
318. Lande, MB., Jo, I., Zeidel, ML., Somers, M., Harris, HW., Phosphorylation of aquaporin-2 does not alter the membrane water permeability of rat papillary water channel-containing vesicles. *J. Biol. Chem.* 271, 5552-5557, 1996.
319. Landgraf, R., Gerstberger, R., Montkowski, A., Probst, JC., Wotjak, CT., Holsboer, F., Engelmann, M., V1 vasopressin receptor antisense oligodeoxynucleotide into septum reduces vasopressin binding, social discrimination abilities and anxiety-related behavior in rats. *J. Neurosci.* 15, 4250-4258, 1995.
320. Langford, HG., Fallis, N., Diuretic effect of angiotensin in the chicken. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 123, 317-321, 1966.
321. Lau, KK., Yang, Y., Cook, GA., Wyatt, RJ., Nishimura, H., Control of aquaporin 2 expression in collecting ducts of quail kidneys. *Gen. Comp. Endocrinol.* 160, 288-294, 2009.
322. Laverty, G., Renal tubular transport in the avian kidney. In: *Avian Osmoregulation* (Eds: Hughes, MR., Chadwick, A.), Leeds Philosophical and Literary Society (Scientific Section), Leeds, United Kingdom, 243-261, 1989.
323. Laverty, G., Dantzler, WH., Micropuncture of superficial nephrons in avian (*Sturnus vulgaris*) kidney. *Am. J. Physiol.* 243, F561-F569, 1982.
324. Laverty, G., Dantzler, WH., Micropuncture study of urate transport by superficial nephrons in avian (*Sturnus vulgaris*) kidney. *Pflügers Arch. – Eur. J. Physiol.* 397, 232-236, 1983.
325. Laverty, G., Alberici, M., Micropuncture study of proximal tubule pH in avian kidney. *Am. J. Physiol.* 253, R587-R591, 1987.
326. Laycock, JF., Hanoune, J., From vasopressin receptor to water channel: intracellular traffic, constraint and by-pass. *J. Endocrinol.* 159, 361-372, 1998.
327. Layton, HE., Davies, JM., Casotti, G., Braun, EJ., Mathematical model of an avian urine concentrating mechanism. *Am. J. Physiol.* 279, F1139-F1160, 2000.
328. Leary, AM., Roberts, JR., Sharp, PJ., The effect of infusion of hypertonic saline on glomerular filtration rate and arginine vasotocin, prolactin and aldosterone in the domestic chicken. *J. Comp. Physiol. B.* 168, 313-321, 1998.
329. Liddell, E., Weeks, I., Immunolocalisation. In: *Antikörpertechniken*. Spektrum (Ed: Weeks, I.), Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford. 1996.
330. Lolait, SJ., O'Carroll, AM., Mc Bride, OW., Konig, M., Morel, A., Brownstein, M., Cloning and characterization of a vasopressin V2 receptor and possible link to nephrogenic diabetes insipidus. *Nature*, 257, 336-339, 1992.
331. Long, S., Acid-base balance and urinary acidification in birds. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 71, 519-526, 1982.
332. Long, S., Skadhauge, E., The role of urinary precipitates in the excretion of electrolytes and urate in the domestic fowl. *J. Exp. Biol.* 104, 41-50, 1983a.
333. Long, S., Skadhauge, E., Renal acid excretion in the domestic fowl. *J. Exp. Biol.* 104, 51-58, 1983b.

334. Lorenz, D., Krylov, A., Hahm, D., Hagen, V., Rosenthal, W., Pohl, P., Maric, K., Cyclic AMP is sufficient for triggering the exocytic recruitment of aquaporin-2 in renal epithelial cells. *EMBO. J. Rep.* 4, 88-93, 2003.
335. Lu, M., Lee, MD., Smith, BL., Jung, JS., Agre, P., Verdijk, MA., Merks, G., Rijss, JP., Deen, PMT., The human AQP4 gene: definition of the locus encoding two water channel polypeptides in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 10908-10912, 1996.
336. Lu, H., Sun, TX., Bouley, R., Blackburn K., McLaughlin, M., Brown, D., Inhibition of endocytosis causes phosphorylation (S256)- independent plasma membrane accumulation of AQP2. *Am. J. Physiol.* 286, F233-F243, 2004.
337. Ma, T., Hasegawa, H., Skach, WR., Frigeri, A., Verkman, AS., Expression, functional analysis and *in situ* hybridization of a cloned rat kidney collecting duct water channel. *Am. J. Physiol.* 266, C189-C197, 1994.
338. Ma, T., Yang, B., Gillespie, A., Carlson, EJ., Epstein, CJ., Verkman, AS., Severely impaired urinary concentrating ability in transgenic mice lacking aquaporin-1 water channels. *J. Biol. Chem.* 273, 4296-4299, 1998.
339. Mandon, B., Chou, CL., Nielsen, S., Knepper, MA., Syntaxin-4 is localized to the apical plasma membrane of renal collecting duct cells: possible role in aquaporin-2 trafficking. *J. Clin. Invest.* 98, 906-913, 1996.
340. Mandon, B., Nielsen, S., Kishore, BK., Knepper, MA., Expression of syntaxins in rat kidney. *Am. J. Physiol.* 273, F718-F730, 1997.
341. Maney, DL., Goode, CT., Wingfield, JC., Intraventricular infusion of arginine vasotocin induces singing in a female songbird. *J. Neuroendocrinol.* 9, 487-491, 1997.
342. Marples, D. Barber, B., Taylor, A., Effect of a dynein inhibitor on vasopressin action in toad urinary bladder. *J. Physiol. (London)*. 490, 767-774, 1996.
343. Marples, D., Knepper, MA., Christensen, EI., Nielsen, S., Redistribution of aquaporin-2 water channels induced by vasopressin in rat kidney inner medullary collecting duct. *Am. J. Physiol.* 269, C655-C664, 1995.
344. Marples, D., Schroer, TA., Ahrens, N., Taylor, A., Knepper, MA., Nielsen, S., Dynein and dynactin colocalize with AQP2 water channels in intracellular vesicles from kidney collecting duct. *Am. J. Physiol.* 274, F384-F394, 1998.
345. Matsumura, Y., Uchida, S., Rai, T., Sasaki, S., Marumo, F., Transcriptional regulation of aquaporin-2 water channel gene by cAMP. *J. Am. Soc. Nephrol.* 8, 861-867, 1997.
346. McCracken, D., Dantzler, WH., Braun, EJ., Binding of antidiuretic hormone in renal cell membrane fragments from normal and nephrogenic diabetes insipidus (NDI) domestic fowl. *FASEB J.* 8, 4838, 1994.
347. McNabb, RA., Urate excretion by the avian kidney. *Comp. Biochem. Physiol.* 51A, 253-258, 1975.
348. McNabb, FMA., McNabb, RA., Steeves, HR., Renal mucoid materials in pigeons fed high and low protein diets. *Auk.* 90, 14-18, 1973.
349. Mc Niven, MA., Cao, H., Pitts, KR., Yoon, Y., The dynamin family of mechano-enzymes: pinching in new places. *Trends Biochem. Sci.* 25, 115-120, 2000.

350. Michel, G., Junge, D., Zur mikroskopischen Anatomie der Niere bei Huhn und Ente. *Anat. Anz.* 131, 124-134, 1972.
351. Michimata, M., Nogae, S., Ohta, M., Kaizuma, S., Imai, Y., Ito, S., Matsubara, M., Topographic distribution of aquaporin 2 mRNA in the kidney of dehydrated rats. *Exp. Nephrol.* 8, 28-36, 2000.
352. Mifune, H., Suzuki, S., Nokihara, K., Noda, Y., Distribution of immunoreactive atrial and brain natriuretic peptides in the heart of the chicken, quail, snake and frog. *Exp. Anim.* 45, 125-133, 1996.
353. Mikhailova, MV., Jurkevich, A., Kuenzel, WJ., Madison, F., Periasamy, A., Chen, Y., Cornett, LE., Heterooligomerization between vasotocin and corticotropin-releasing hormone (CRH) receptors augments CRH-stimulated 3',5'-cyclic adenosine monophosphate production. *Mol. Endocrinol.* 21, 2178-2188, 2007.
354. Milton, A., Odland, B., Renal tubular accumulation of organic substances: a new *in vivo* method which differentiates between luminal and peritubular uptake. *Acta Physiol. Scand.* 123, 237-248, 1985.
355. Mitra, AK., Three-dimensional organization of the aquaporin water channel: what can structure tell us about function? *Vitam. Horm.* 62, 133-166, 2001.
356. Miwa, T., Nishimura, H., Diluting segment in avian kidney. II. Water and chloride transport. *Am. J. Physiol.* 250, R341-R347, 1986.
357. Minvielle, F., Grossmann, R., Gourichon, D., Development and performances of a Japanese quail line homozygous for the diabetes insipidus (di) mutation. *Poult. Sci.* 86, 249-254, 2007.
358. Miyata, A., Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H., Identification of a 29-amino acid natriuretic peptide in chicken heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155, 1330-1337, 1988.
359. Möhring, J., Schoun, J., Simon-Oppermann, C., Simon, E., Radioimmunoassay for arginine-vasotocin (AVT) in serum of Pekin ducks: AVT concentrations after adaptation to fresh water and salt water. *Pflügers Arch. – Eur. J. Physiol.* 387, 91-97, 1980.
360. Møller, H.B., MacAuley, N., Knepper, M.A., Fenton, R.A., Role of multiple phosphorylation sites in the COOH-terminal tail of aquaporin-2 for water transport: evidence against channel gating. *Am. J. Physiol.* 296, F649-F657, 2009.
361. Monici M., Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol. Annu Rev.* 11, 227-56, 2005.
362. Morel, A., O'Carroll, AM., Brownstein, MJ., Lolait, SJ., Molecular cloning and expression of rat V1a arginine vasopressin receptor. *Nature.* 356, 523-526, 1992.
363. Morild, I., Bohle, A., Christensen, JA., Structure of the avian kidney. *Anat. Rec.* 212, 33-40, 1985a.
364. Morild, I., Christensen, JA., Halvorsen, OJ., Farstad, M., Effect of volume depletion on the afferent arterioles in the avian kidney. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.* 411, 149-155, 1987.
365. Morild, I., Christensen, JA., Mikeler, E., Bohle, A., Peripolar cells in the avian kidney. *Virchows. Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.* 412, 471-477, 1988.

366. Morild, I., Mowinckel, R., Bohle, A., Christensen, JA., The juxtaglomerular apparatus in the avian kidney. *Cell. Tissue Res.* 240, 209-214, 1985b.
367. Moore, FL., Evolutionary precedents for behavioral actions of oxytocin and vasopressin. *Ann. NY. Acad. Sci.* 652, 156-165, 1992.
368. Moore, LC., Schnermann, J., Yarimizu, S., Feedback mediation of SNGFR autoregulation in hydropenic and DOCA- and salt- loaded rats. *Am. J. Physiol.* 237, F63-F74, 1979.
369. Müller, AR., Gerstberger, R., Ontogenesis of the angiotensin II (ANG II) receptor system in the duck brain. *Brain. Res. Dev. Brain. Res.* 18, 10-16, 1994.
370. Müller, J., Kachadorian, WA., Aggregate-carrying membranes during ADH stimulation and washout in toad bladder. *Am. J. Physiol.* 247, C90-C98, 1984.
371. Müller, J., Kachadorian, WA., DiScala, VA., Evidence that ADH-stimulated intramembrane particle aggregates are transferred from cytoplasmic to luminal membranes in toad bladder epithelia cells. *J. Cell. Biol.* 85, 83-95, 1980.
372. Müller, C., Sendler, M., Hildebrandt, JP., Downregulation of Aquaporins 1 and 5 in nasal gland by osmotic stress in ducklings, *Anas platyrhynchos*: implications for the production of hypertonic fluid. *J. Exp. Biol.* 209, 4067-4076, 2006.
373. Munsick, RA., Neurohypophysial hormones of chickens and turkeys. *Endocrinology.* 75, 104-112, 1964.
374. Munsick, RA., Sawyer, WH., van Dyke, HB., Avian neurohypophysial hormones: pharmacological properties and tentative identification. *Endocrinology* 66, 860-871, 1960.
375. Murphy, C., Saffrich, R., Grummt, M., Gournier, H., Rybin, V., Rubino, M., Auvinen, P., Lutcke, A., Parton, RG., Zerial, M., Endosome dynamics regulated by a Rho protein. *Nature.* 384, 427-432, 1996.
376. Musch, A., Microtubule organization and function in epithelial cells. *Traffic* 5, 1-9, 2004.
377. Muth, TR., Caplan, MJ., Transport protein trafficking in polarized cells. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 19, 333-366, 2003.
378. Mütze, J., Roth, J., Gerstberger, R., Matsumura, K., Hübschle, T., Immunohistochemical evidence of functional leptin receptor expression in neuronal and endothelial cells of the rat brain. *Neurosci. Lett.* 394, 105-110, 2006.
379. Mütze, K., Reuter, B., Gerstberger, R., Vasotocin-induced cellular translocation of Aquaporin-2 water channels in collecting ducts of the chicken kidney. *Leipz. Blaue Hefte*, 4, 92, 2008.
380. Narbaitz, R., Kacew, S., Ultrastructural and biochemical observations on the metanephros of normal and cultured chick embryos. *Anat. Embryol. (Berlin)*, 155, 95-105, 1978.
381. Natke, C., Gerstberger, R., Grossmann, R., Angiotensin II-binding sites in chicken brain and pituitary: autoradiographic localization. *Cell. Tissue. Res.* 283, 297-303, 1996.
382. Navar, LG., Renal autoregulation: perspectives from whole kidney and single nephron studies. *Am. J. Physiol.* 234, F357-370, 1978.

383. Neely, JD., Christensen, BM., Nielsen, S., Agre, P., Heterotetrametric composition of aquaporin-4 water channels. *Biochemistry*. 38, 11156-11163, 1999.
384. Nejsum, LN., The renal plumbing system: aquaporin water channels. *Cell. Mol. Life. Sci.* 62, 1692-1706, 2005.
385. Nicholson, JK., The microanatomy of the distal tubules, collecting tubules and collecting ducts of the starling kidney. *J. Anat.* 134, 11-23, 1982.
386. Nicholson, JK. Kendall, MD., The fine structure of dark or intercalated cells from the distal and collecting tubules of avian kidneys. *J. Anat.* 136, 145-156, 1983.
387. Nielsen, S., Chou, CL., Marples, D., Christensen, EI., Kishore, BK., Knepper, MA., Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 1013-1017, 1995a.
388. Nielsen, S., DiGiovanni, SR., Christensen, EI., Knepper, MA., Harris, HW., Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressin-regulated water channel in rat kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 11663-11667, 1993a.
389. Nielsen, S., Marples, D., Birn, H., Mohtashami, M., Dalby, N. O., Trimble, M., Knepper, M., Expression of VAMP- 2- like protein in kidney collecting duct intrazellular vesicles. Colocalization with aquaporin- 2 water channels. *J. Clin. Invest.* 96, 1834-1844, 1995b.
390. Nielsen, S., Smith, B. L., Christensen, E. L., Agre, P., Distribution of the aquaporin CHIP in secretory and resorptive epithelia and capillary endothelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 7275-7279, 1993b.
391. Nielsen, S. Smith, B., Christensen, EI., Knepper, MA., Agre, P., CHIP28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron. *J. Cell. Biol.* 120, 371-383, 1993c.
392. Nishimoto, G., Zelenina, M., Li, D., Yasui, M., Aperia, A., Nielsen, S., Nairn, A. C., Arginine vasopressin stimulates phosphorylation of aquaporin-2 in rat renal tissue. *Am. J. Physiol.* 276, F254-F259, 1999.
393. Nishimura, H., Countercurrent urine concentration in birds. In: *New Insight in Vertebrate Kidney Function* (Eds: Brown, JA., Balment, RJ., Rankin, JC.). Cambridge University Press, Soc. Exp. Biol. Sem. Ser. 52, 189-212, 1993.
394. Nishimura, H., Urine concentration and avian aquaporin water channels. *Pflügers. Arch. - Eur. J. Physiol.* 755-768, 2008.
395. Nishimura, H., Urine concentration in birds. In: *Avian Osmoregulation* (Eds: Hughes, MR., Chadwick A.), Leeds Philosophical and Literary Society (Scientific Section), Leeds. United Kingdom. 225-242, 1989.
396. Nishimura, H., Bailey, JR., Intrarenal renin-angiotensin system in primitive vertebrates. *Kidney Int. Suppl.* 12, S185-S192, 1982.
397. Nishimura, H., Fan, Z., Sodium and water transport and urine concentration in avian kidney. In: *Osmoregulation and drinking in vertebrates*, edited by Hazon N and Flik G. Oxford, UK: Bios. Scientific. 129-151, 2002.
398. Nishimura, H., Fan, Z., Regulation of water movement across vertebrate renal tubules. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 136, 479-498, 2003.

399. Nishimura, H., Imai, M., Ogawa, M., Diluting segment in avian kidney. I. Characterization of transepithelial voltages. *Am. J. Physiol.* 250, R333-R340, 1986.
400. Nishimura, H., Koseki, C., Imai, M., Braun, EJ., Sodium chloride and water transport in the thin descending limb of Henle of the quail. *Am. J. Physiol.* 257, F994-F1002, 1989.
401. Nishimura, H., Koseki, C., Patel, TB., Water transport in collecting ducts of Japanese quail. *Am. J. Physiol.* 271, R1535-R1543, 1996.
402. Nishimura, H., Nakamura, Y., Sumner, RP., Khosla, MC., Vasopressor and depressor actions of angiotensin in the anesthetized fowl. *Am. J. Physiol.* 242, H314-H324, 1982.
403. Nishimura, H., Miwa, T., Bailey, JR., Renal handling of sodium chloride and its control in birds. *J. Exp. Zool.* 232, 697-705, 1984.
404. Nishimura, H., Walker, OE., Patton, CM., Madison, AB., Chiu, AT., Keiser, J., Novel angiotensin receptor subtypes in fowl. *Am. J. Physiol.* 267, R1174-R1181, 1994.
405. Nishimura, H., Yang, Y., Hubert, C., Gasc, JM., Ruijtenbeek, K., De Mey, J., Struijker-Boudier, HAJ., Corvol, P., Maturation-dependent changes of angiotensin receptor expression in fowl. *Am. J. Physiol.* 285, R231-R242, 2003.
406. Nishimura, H., Yang, Y., Lau, K., Kuykindoll, RJ., Fan, Z., Yamaguchi, K., Yamamoto, T., Aquaporin-2 water channel in developing quail kidney: possible role in programming adult fluid homeostasis. *Am. J. Physiol.* 293, R2147-R2158, 2007.
407. Noda, Y., Horikawa, S., Furukawa, T., Hirai, K., Katayama, Y., Asai, T., Kuwahara, M., Katagiri, K., Kinashi, T., Hattori, M., Minato, N., Sasaki, S., Aquaporin-2 trafficking is regulated by PDZ-domain containing protein SPA- 1. *FEBS. Lett.* 568, 139-145, 2004a.
408. Noda, Y., Horikawa, S., Katayama, Y., Sasaki, S., Water channel aquaporin-2 directly binds to actin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 740-745, 2004b.
409. Noda, Y., Horikawa, S., Katayama, Y., Sasaki, S., Identification of a multiprotein "motor" complex binding to water channel aquaporin-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330, 1041-1047, 2005.
410. Noda, Y., Sasaki, S., Trafficking mechanism of water channel aquaporin-2. *Biol. Cell.* 97, 885-892, 2005.
411. Nouwen EJ., Decuypere, E., Kuhn, ER., Michels, H., Hall, TR., Chadwick, A., Effect of dehydration, haemorrhage and oviposition on serum concentrations of vasotocin, mesotocin and prolactin in the chicken. *J. Endocrinol.* 102, 345-351, 1984.
412. Obeidah, A., Merat, P., Bordas, A., Polydipsia and polyuria at high environmental temperature in association with the productive traits in the fowl. *Ann. Genet. Sel. Anim.* 9, 431-447, 1977.
413. Ogawa, M., Sokabe, H., The macula densa site of avian kidney. *Z. Zellforsch.* 120, 29-36, 1971.
414. Oksche, A., Rosenthal, W., Molecular basis of nephrogenic diabetes insipidus. *J. Mol. Med.* 76, 316-337, 1998.

415. Onishi, Y., Akabane, G., Hasagawa, T., Mochida, H., Matsuda, M., Suzuki, M., Tanaka, S., Water adaptation strategy in anuran amphibians: molecular diversity of aquaporin. *Endocrinology* 151, 165-173, 2010.
416. Orloff, J., Davidson, DG., The mechanism of potassium excretion in the chicken. *J. Clin. Invest.* 38, 21-30, 1959.
417. Orloff, J., Burg, M., Effect of strophanthidin on electrolyte excretion in the chicken. *Am. J. Physiol.* 199, 49-54, 1960.
418. Oshio, K., Song, Y., Verkman, AS., Manley, GT., Aquaporin-1 deletion reduces osmotic water permeability and cerebrospinal fluid production. *Acta Neurochir. Suppl.* 86, 525-528, 2003.
419. Osono, E., Nishimura, H., Control of sodium and chloride transport in the thick ascending limb in the avian nephron. *Am. J. Physiol.* 267, R455-R462, 1994.
420. Ostrowski, NL., Young, WS., Knepper, MA., Lolait, SJ., Expression of vasopressin V1a and V2 receptor messenger ribonucleic acid in the liver and kidney of embryonic, developing and adult rats. *Endocrinology.* 133, 1849-1859, 1993.
421. Pak Poy, RK., Robertson, JS., Electron microscopy of the avian renal glomerulus. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 3, 183-192, 1957.
422. Pang, PK., Sawyer, WH., Renal and vascular responses of the bullfrog (*Rana catesbeiana*) to mesotocin. *Am. J. Physiol.* 235, F151-F155, 1978.
423. Pang, PK., Uchiyama, M., Sawyer, WH., Endocrine and neural control of amphibian renal functions. *Fed. Proc.* 41, 2365-2373, 1982.
424. Pearl, M., Taylor, A., Role of the cytoskeleton in the control of transcellular water flow by vasopressin in amphibian urinary bladder. *Biol. Cell.* 55, 163-172, 1985.
425. Perrott, MN., Sainsbury, RJ, Balment, RJ., Peptide hormone-stimulated second messenger production in the teleostean nephron. *Gen. Comp. Endocrinol.* 89, 387-395, 1993.
426. Pi, M., Spurney, RF., Tu, Q., Hinson, T., Quarles, LD., Calcium-sensing receptor activation of rho involves filamin and  $\rho$ -guanine nucleotide exchange factor. *Endocrinology.* 143, 3830-3838, 2002.
427. Phillips, ME., Taylor, A., Effect of nocodazole on the water permeability response to vasopressin in rabbit collecting tubules perfused *in vitro*. *J. Physiol. (London).* 411, 529-544, 1989.
428. Phillips, ME., Taylor, A., Effect of colcemid on the water permeability response to vasopressin in isolated perfused rabbit collecting tubules. *J. Physiol. (London).* 456, 591-608, 1992.
429. Polishchuk, R., Di Pentima, A., Lippincott-Schwartz, J., Delivery of raft-associated, GPI-anchored proteins to the apical surface of polarized MDCK cells by a transcytotic pathway. *Nat. Cell. Biol.* 6, 297-307, 2004.
430. Poulson, TL., Countercurrent multipliers in avian kidneys. *Science.* 148, 389-391, 1965.
431. Powers, DR., McWhorter, TJ., Kimberly, DJ., Baker, TL., Thornburg, KL., Characterization and distribution of aquaporin channels in the hummingbird gastrointestinal tract. *Society for Integrative and Comparative Biology*, Los Angeles, CA. P2.92A, 469, 2002.

432. Preston, GM., Agre, P., Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 11110-11114, 1991.
433. Preston, GM., Carroll, TP., Guggino, WB., Agre, P., Appearance of water channels in *Xenopus oocytes* expressing red cell CHIP28 protein. *Science.* 256, 385-387, 1992.
434. Preston, GM., Jung, JS., Guggino, WB., Agre, P., The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel. *J. Biol. Chem.* 268, 17-20, 1993.
435. Preston, GM., Jung, JS., Guggino, WB., Agre, P., Membrane topology of aquaporin CHIP. Analysis of functional epitope-scanning mutants by vectorial proteolysis. *J. Biol. Chem.* 269, 1668-1673, 1994.
436. Procino, G., Carmosino, M., Marin, O., Brunati, AM., Contri, A., Pinna, LA., Mannucci, R., Nielsen, S., Kwon, TH., Svelto, M., Valenti, G., Ser-256 phosphorylation dynamics of aquaporin2 during maturation from the endoplasmatic reticulum to the vesicular compartment in renal cells. *FASEB J.* 17, 1886-1888, 2003.
437. Procino, G., Carmosino, M., Tamma, G., Gouraud, S., Laera, A., Riccardi, D., Svelto, M., Valenti, S., Extracellular calcium antagonizes forskolin-induced aquaporin 2 trafficking in collecting duct cells. *Kidney Int.* 66, 2245-2255, 2004.
438. Raffel, LJ., Buss, EG., Clagett, CO., Influence of arginine vasotocin on a genetically determined excessive appetite for water in chickens. *Poultry Sci.* 55, 1834-1840, 1976.
439. Ramirez-Lorca, R., Munoz-Cabello, AM., Toledo-Aral, JJ., Ilundain, AA., Echevarria, M., Aquaporins in chicken: Lokalisation of ck-AQP5 along the small and large intestine. *Comp. Biochem. Physiol.* 143, 269-277, 2006.
440. Ravichandran, V., Chawla, A., Roche, P. A., Identification of a novel syntaxin- and synaptobrevin/VAMP-binding protein, SNAP-23, expressed in non-neuronal tissues. *J. Biol. Chem.* 271, 13300-13303, 1996.
441. Repke, H., Liebmann, C., Membranrezeptoren und ihre Effektorsysteme. Theoretische und praktische Grundlagen der Rezeptorforschung, Wiley Press, 1990.
442. Renfro, JL., Clark, NB., Parathyroid hormone effect on chicken renal brush-border membrane phosphate transport. *Am. J. Physiol.* 247, R302-R307, 1984.
443. Renfro, JL., Clark, NB., Metts, RE., Lynch, MA., Sulfate transport by chick renal tubule brush-border and basolateral membranes. *Am. J. Physiol.* 252, R85-R93, 1987.
444. Rennick, BR., Transport mechanisms for renal tubular excretion of creatinine in the chicken. *Am. J. Physiol.* 212, 1131-1134, 1967.
445. Rennick, BR., Development of renal accumulation of organic ions by chick embryo. *Am. J. Physiol.* 217, 247-250, 1969.
446. Rennick, BR., Renal tubule transport of organic cations. *Am. J. Physiol.* 240, F83-F89, 1981.
447. Ribatti, D., Frigeri, A., Nico, B., Niccia, GP., De Giorgis, M., Roncali, L., Svelto, M., Aquaporin-1 expression in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Anat. Rec.* 268, 85-89, 2002.

448. Riccardi, D., Hall, AE., Chattopadhyay, N., Xu, JZ., Brown, EM., Hebert, SC., Localization of the extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ /polyvalent cation-sensing protein in rat kidney. *Am. J. Physiol.* 274, F611-F622, 1998.
449. Rice, GE., Plasma arginine vasotocin concentrations in the lizard *Varanus gouldii* (Gray) following water loading, salt loading and dehydration. *Gen. Comp. Endocrinol.* 47, 1-6, 1982.
450. Ridderstrale, Y., Ultrastructure and localization of carbonic anhydrase in the avian nephron. *Swed. J. Agric. Res.* 10, 41-55, 1980.
451. Roberts, JR., Renal function and plasma AVT during an acute salt load in feral chickens. *J. Comp. Physiol. B.* 162, 54-58, 1992.
452. Roberts, TJ., Nijland, MJ., Curran, M., Ross, MG., Maternal 1-deamino-8-D-arginine-vasopressin-induced sequential decreases in plasma sodium concentration: ovine fetal renal responses. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 180, 82-90, 1999.
453. Roberts, JR., Baudinette, RV., The water economy of stubble quail, *coturnix pectoralis*, and king quail, *coturnix chinensis*. *Aust. J. Zool.* 32, 637-647, 1984.
454. Robertson, GL., Diabetes insipidus. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.* 24, 549-572, 1995.
455. Robertson, GL., Physiology of ADH secretion. *Kidney Int.* 21, S20-S26, 1987.
456. Robinzon, B., Koike, TI., Marks, PA., Cardiovascular effects of angiotensin-II in chickens. *Br. Poult. Sci.* 36, 655-665, 1995.
457. Rose, CE., Rose, KY, Kinter, LB, Effect of  $V_1/V_2$ -receptor antagonism on renal function and response to vasopressin in conscious dogs. *Am. J. Physiol.* 260, F273-F282, 1991.
458. Rosenberg, J., Pines, M., Hurwitz, S., Inhibition of aldosterone secretion by atrial natriuretic peptide in chicken adrenocortical cells. *Biochem. Biophys. Acta.* 1014, 189-194, 1989.
459. Rummel, C., Voss, T., Matsumura, K., Korte, S., Gerstberger, R., Roth, J., Hübschle, T., Nuclear STAT3 translocation in guinea pig and rat brain endothelium during systemic challenge with lipopolysaccharide and interleukin-6. *J. Comp. Neurol.* 491, 1-14, 2005.
460. Sabolic, I., Katsura, T., Verbavatz, JM., Brown, D., The AQP2 water channel: Effect of vasopressin treatment, microtubule disruption and distribution in neonatal rats. *J. Membr. Biol.* 143, 165-175, 1995.
461. Sachs, Statistikbuch, 2004.
462. Saito, N., Fujii, M., Sugiura, K., Aste, N., Shimada, K., TonEBP regulates hyperosmolality-induced arginine vasotocin gene expression in the chick (*Gallus domesticus*). *Neurosci. Lett.* 468, 334-338, 2010.
463. Saito, N., Ikegami, H., Shimada, K., Effect of water deprivation on Aquaporin-4 (AQP4) mRNA expression in chickens (*Gallus domesticus*). *Mol. Brain. Res.* 141, 193-197, 2005.
464. Saito, T., Ishikawa, S. E., Sasaki, S., Fujita, N., Fushimi, K., Okada, K., Takeuchi, K., Sakamoto, A., Ookawara, S., Kaneko, T., Marumo, F., Alteration in water channel AQP-2 by removal of AVP stimulation in collecting duct cells of dehydrated rats. *Am. J. Physiol.* 272, F183-F191, 1997.

465. Saito, N., Sasaki, T., Furuse, M., Arakawa, K., Shimada, K., Effect of AVT antisense oligodeoxynucleotides on AVT release induced by hypertonic stimulation in chicks. *Comp. Biochem. Physiol. A* 128, 147-153, 2001.
466. Saito, N., Shimada, K., Koike, TI., Interrelationship between arginine vasotocin, prostaglandin and uterine contractility in the control of oviposition in the hen (*Gallus domesticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 67, 342-347, 1987.
467. Salomon, FV., Lehrbuch der Geflügelanatomie. Verlag Fischer, Jena, Stuttgart, 1993.
468. Sanchez, F., Panzica, GC., Viglietti-Panzica, C., Aste, N., Carretero, J., Vazquez, R., A comparative analysis of the vasotocin and vasopressin systems in the chicken and rat hypothalamus. An immunocytochemical study. *J. Hirnforsch.* 32, 27-37, 1991.
469. Sands, J. M., Flores. FX., Kato, A., Baum, MA., Brown, EM., Ward, DT., Hebert, SC., Harris, HW., Vasopressin-elicited water and urea permeabilities are altered in IMCD in hypercalcemic rats. *Am. J. Physiol.* 274, F978-F985, 1998.
470. Sands, JM., Naruse, M., Baum, M., Jo, I., Hebert, SC., Brown, EM., Harris, HW., Apical extracellular calcium/polyvalent cation-sensing receptor regulates vasopressin-elicited water permeability in rat kidney inner medullary collecting duct. *J. Clin. Invest.* 99, 1399-1405, 1997.
471. Sasaki, T., Shimada, K., Saito, N., Changes of AVT levels in plasma, neurohypophysis and hypothalamus in relation to oviposition in the laying hen. *Comp. Biochem. Physiol. A* 121, 149-153, 1998.
472. Sawyer, WH., Evolution of neurohypophyseal hormones and their receptors. *Fed. Proc.* 36, 1842-1847, 1977.
473. Sawyer, WH., Uchiyama, M., Pang, PK., Control of renal functions in lungfishes. *Fed. Proc.* 41, 2361-2364, 1982.
474. Scatchard, G., The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. NY. Acad. Sci.* 51, 660-672, 1949.
475. Schäfer, F., Müller, AR., Schmid, HA., Gerstberger, R., Simon, E., Angiotensin II receptor subtypes in the duck subfornical organ: an electrophysiological and receptor autoradiographic investigation. *Brain. Res.* 4, 118-124, 1996.
476. Schaffenburg, CA., Haas, E., Goldblatt, H., Concentration of renin in kidneys and angiotensin in serum of various species. *Am. J. Physiol.* 199, 788-792, 1960.
477. Schenk, AD., Werten, PJJ., Scheuring, S., de Groot, BL., Müller, SA., Stahlberg, H., Philippsen, A., Engel, A., The 4.5 Å structure of human AQP2. *J. Mol. Biol.* 350, 278-289, 2005.
478. Schmid, HA., Simon, E., Effect of angiotensin II and atrial natriuretic factor on neurons in the subfornical organ of ducks and rats in vitro. *Brain. Res.* 588, 324-328, 1992.
479. Schott, HC., Bayly, WM., Reed, SM., Brobst, DF., Nephrogenic diabetes insipidus in sibbling colts. *J. Vet. Intern. Med.* 7, 68-72, 1993.
480. Schrier, RW., Body water homeostasis: clinical disorders of urinary dilution and concentration. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17, 1820-1832, 2006.

481. Schrier, RW., The sea within us: disorders of body water homeostasis. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 16, 348-352, 2007.
482. Schütz, H., Gray, DA., Gerstberger, R., Modulation of kidney function in conscious Peking ducks by atrial natriuretic factor. *Endocrinology.* 130, 678-684, 1992.
483. Seth, R., Köhler, A., Grossmann, R., Chaturvedi, M., Expression of hypothalamic arginine vasotocin gene in response to water deprivation and sex steroid administration in female Japanese quail. *J. Exp. Biol.* 207, 3025-3033, 2004a.
484. Seth, R., Xu, YX., Grossmann, R., Chaturvedi, CM., Changes in expression of AVT and AVT receptor (VT1) gene in hypothalamus and shell gland in relation to egg laying in white leghorn hen. *Gen. Comp. Endocrinol.* 137, 177-186, 2004b.
485. Sever, S., Damke, H., Schmid, SL., Garrotes, springs, ratchets and whips: putting dynamin models to the test. *Traffic* 1, 385-392, 2000.
486. Sharp, PJ., Li, Q., Talbot, RT., Barker, P., Huskisson, N., Lea, RW., Identification of hypothalamic nuclei involved in osmoregulation using fos immunocytochemistry in the domestic hen (*Gallus domesticus*), ring dove (*Streptopelia risoria*), Japanese quail (*Coturnix japonica*) and zebra finch (*Taenopygia guttata*). *Cell Tissue Res.* 282, 351-361, 1995.
487. Shi, PP., Cao, XR., Qu, J., Volk, KA., Kirby, P., Williamson, RA., Stokes, JB., Yang, B., Nephrogenic diabetes insipidus in mice caused by deleting COOH-terminal tail of aquaporin-2. *Am. J. Physiol.* 292, F1334-F1344, 2007.
488. Shi, L., Skach, WR., Verkman, AS., Functional independence of monomeric CHIP28 water channels revealed by expression of wild-type mutant heterodimers. *J. Biol. Chem.* 269, 10417-10422, 1994.
489. Shimada, K., Neldon, HL., Koike, TI., Arginine vasotocin (AVT) release in relation to uterine contractility in the hen. *Gen. Comp. Endocrinol.* 64, 362-367, 1986.
490. Shoemaker, VH., Osmoregulation and excretion in birds. In: *Avian Biology*, Vol. 2, (Eds: Farner, DS., King JR., Parkes, KC.), Academic Press, London. 527-574, 1972.
491. Siller, W.G., Structure of the kidney. In: *Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl*. Bell, DJ., Freeman, BM., Eds., Academic Press, New York und London. 1, 197-231, 1971.
492. Siller, WG., Hindle., RM., The arterial blood supply to the kidney of the fowl. *J. Anat.* 104, 117-135, 1969.
493. Siller, WG., Wright, PA., An ultrastructural study of the liver, kidney and myocardium in the fatty liver and kidney syndrom in the fowl. *Res. Vet. Sci.* 21, 79-89, 1976.
494. Silveira, PF., Koike, TI., Schiripa, LN., Reichl, AP., Magnoli, FC., Plasma arginine-vasotocin and hydroosmotic status of the terrestrial pit viper *Bothrops jararaca*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 109, 336-346, 1998.
495. Simon, H., Gao, Y., Franki, N., Hays, R. M., Vasopressin depolymerizes apical F-actin in rat inner medullary collecting duct. *Am. J. Physiol.* 265, C757-C762, 1993.
496. Simon, E., Gerstberger, R., Gray, DA., Central angiotensin II responsiveness in birds. *Prog. Neurobiol.* 39, 179-207, 1992.

497. Simon, E., Schmid, HA., Effects of angiotensin II and its blockers Sar1-Ile8-angiotensin II and Du 753 on drinking in ducks in relation to properties of subfornical organ neurons. *J. Comp. Physiol. B.* 165, 607-614, 1996.
498. Simon-Oppermann, C., Gray, D., Szczepanska-Sadowska, E., Simon, E., Blood volume changes and arginine vasotocin (AVT) blood concentration in conscious fresh water and salt water adapted ducks. *Pflügers. Arch. - Eur. J. Physiol.* 400, 151-159, 1984.
499. Simon-Oppermann, C., Simon, E., Osmotic and volume control of diuresis in conscious ducks (*Anas platyrhynchos*). *J. Comp. Physiol.* 146, 17-25, 1982.
500. Simon-Oppermann, C., Simon, E., Deutsch, H., Möhring, J., Schoun, J., Serum arginine vasotocin (AVT) and afferent and central control of osmoregulation in conscious Pekin ducks. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 387, 99-106, 1980.
501. Siner, J., Paredes, A., Hosselet, C., Hammond, T., Strange, K., Harris, HW., Cloning of an aquaporin homologue present in water channel containing endosomes of toad urinary bladder. *Am. J. Physiol.* 270, C372-C381, 1996.
502. Skach, WR., Shi, L., Calayag, MC., Frigeri, A., Lingappa, VR., Verkman, AS., Biogenesis and transmembrane topology of the CHIP28 water channel at the endoplasmatic reticulum. *J. Cell. Biol.* 125, 803-815, 1994.
503. Skadhauge, E., Does antidiuretic hormone act on kidney cells from the blood side or from the urine side? *Acta Physiol. Scand.* 59 Suppl. 213, 143, 1963.
504. Skadhauge, E., Effects of unilateral infusion of arginine-vasotocin into the portal circulation of the avian kidney. *Acta Endocrinol. Copenhagen.* 47, 321-330, 1964.
505. Skadhauge, E., *Osmoregulation in Birds.* Berlin: Springer-Verlag, New York. 1981.
506. Skadhauge, E., Solute composition of the osmotic space of ureteral urine in dehydrated chickens (*Gallus domesticus*). *Comp. Biochem. Physiol. A.* 56, 271-274, 1977.
507. Skadhauge, E., Schmidt-Nielsen, B., Renal function in domestic fowl. *Am. J. Physiol.* 212, 793-798, 1967a.
508. Skadhauge, E., Schmidt-Nielsen, B., Renal medullary electrolyte and urea gradient in chickens and turkeys. *Am. J. Physiol.* 212, 1313-1318, 1967b.
509. Smith, FD., Scott, JD., Signaling complexes: junctions on the intracellular information super highway. *Curr. Biol.* 12, R32-R40, 2002.
510. Sokabe, H., Phylogeny of the renal effects of angiotensin. *Kidney Int.* 6, 263-271, 1974.
511. Sperber, I., Excretion. In: *Biology and Comparative Physiology of Birds*, (Ed: Marshall, AJ.), Academic Press, New York. 469-492, 1960.
512. Sperber, J., Investigations on the circulatory system of the avian kidney. *Zool. Bidrag. Uppsala.* 27, 429-448, 1948.
513. Springate, JE., Fildes, RD., Hong, SK., Feld, LG., Acara, M., Renal effects of atrial natriuretic factor in domestic fowl. *Life Sci.* 40, 915-920, 1987.
514. Srivastava, R., Cornett, LE., Chaturvedi, CM., Effect of photoperiod and estrogen on expression of arginine vasotocin and its oxytocin-like receptor in the shell gland of the Japanese quail. *Comp. Biochem. Physiol. A* 148, 451-457, 2007.

515. Srivastava, R., Cornett, LE., Chaturvedi, CM., Age-dependent expression of AVT and its oxytocic-like receptor VT3 in the shell gland of Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*. Gen. Comp. Endocrin. 165, 47-52, 2010.
516. Stallone, JN., Braun, EJ., Contributions of glomerular and tubular mechanisms to antidiuresis in conscious domestic fowl. Am. J. Physiol. 249, F842-F850, 1985.
517. Stallone, JN., Braun, EJ., Osmotic and volemic regulation of plasma arginine vasotocin in conscious domestic fowl. Am. J. Physiol. 250, R644-R657, 1986a.
518. Stallone, JN., Braun, EJ., Regulation of plasma arginine vasotocin in conscious water-deprived domestic fowl. Am. J. Physiol. 250, R658-R664, 1986b.
519. Stallone, JN., Nishimura, H., Angiotensin II (AII)-induced natriuresis in anesthetized domestic fowl. Fed. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 44, 1364, 1985.
520. Stallone, JN., Pacelli, MM., Braun, EJ., Arginine vasotocin (AVT) and forskolin (FSK) stimulate medullary cyclic AMP (cAMP) in the avian kidney. FASEB J. 8, 4387, 1994.
521. Star, RA., Nonoguchi, H., Balaban, R., Knepper, MA., Calcium and cyclic adenosine monophosphate as second messengers for vasopressin in the rat inner medullary collecting duct. J. Clin. Invest. 81, 1879-1888, 1988.
522. Steiner, M., Phillips, MI., Renal tubular vasopressin receptors downregulated by dehydration. Am. J. Physiol. 254, C404-C410, 1988.
523. Stoner, LC., The movement of solutes and water across the vertebrate distal nephron. Ren. Physiol. 8, 237-248, 1985.
524. Strange, K., Willingham, MC., Handler, JS., Harris, HW. Jr., Apical membrane endocytosis via coated pits is stimulated by removal of antidiuretic hormone from isolated, perfused rabbit cortical collecting tubule. J. Membr. Biol. 103, 17-28, 1988.
525. Sturkie, PD., Lin YC., Release of vasotocin and oviposition in the hen. J. Endocrinol. 35, 325-326, 1966.
526. Sturkie, PD., Kidneys, extrarenal salt excretion and urine. In: Sturkie PD (ed) Avian physiology. Springer, Berlin Heidelberg New York. 263-285, 1976.
527. Sugimoto, T., Saito, M., Mochizuki, S., Watanabe, Y., Hashimoto, S., Kawashima, H., Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding the human V1b vasopressin receptor. J. Biol. Chem. 269, 27088-27092, 1994.
528. Sugiura, K., Aste, N., Fujii, M., Shimada, K., Saito, N., Effect of hyperosmotic stimulation on aquaporins gene expression in chick kidney. Comp. Biochem. Physiol. 151, 173-179, 2008.
529. Sun, TX., Van Hoek, A., Huang, Y., Bouley, R., McLaughlin, M., Brown, D., Aquaporin-2 localization in clathrin-coated pits: inhibition of endocytosis by dominant-negative dynamin. Am. J. Physiol. 282, F998-F1011, 2002.
530. Suzuki, M., Hasegawa, T., Ogushi, Y., Tanaka, S., Amphibian aquaporins and adaptation to terrestrial environments: a review. Comp. Biochem. Physiol. A 148, 72-82, 2007.
531. Sykes, AH., Formation and composition of urine. In: Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl, Vol.1, Chap. 9, (Eds: Bell, DJ., Freeman, BM.), Academic Press, New York, 233-278, 1971.

532. Tajika, Y., Matsuzaki, T., Suzuki, T., Ablimit, A., Aoki, T., Hagiwara, H., Kuwahara, M., Sasaki, S., Takata, K., Differential regulation of AQP2 trafficking in endosomes by microtubules and actin filaments. *Histochem. Cell Biol.* 124, 1-12, 2005.
533. Takahashi, T., Kawashima, M., Kamiyoshi, M., Tanaka, K., Arginine vasotocin receptor binding in the hen uterus (shell gland) before and after oviposition. *Eur. J. Endocrinol.* 130, 366-372, 1994.
534. Takata, K., Matsuzaki, T., Tajika, Y., Ablimit, A., Hasegawa, T., Localization and trafficking of aquaporin 2 in the kidney. *Histochem. Cell Biol.* 130, 197-209, 2008.
535. Takei, Y., Comparative physiology of body fluid regulation in vertebrates with special reference to thirst regulation. *Jpn. J. Physiol.* 50, 171-186, 2000.
536. Takei, Y., The role of the subfornical organ in drinking induced by angiotensin in the Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*. *Cell. Tissue. Res.* 185, 175-181, 1977.
537. Takei, Y., Hasegawa, Y., Vasopressor and depressor effects of native angiotensins and inhibition of these effects in the Japanese quail. *Gen. Comp. Endocrinol.* 79, 12-22, 1990.
538. Takei, Y., Joss, JM., Kloas, W., Rankin, JC., Identification of angiotensin I in several vertebrate species: its structural and functional evolution. *Gen. Comp. Endocrinol.* 135, 286-292, 2004.
539. Takei, Y., Ogoshi, M., Inoue, K., A "reverse" phylogenetic approach for identification of novel osmoregulatory and cardiovascular hormones in vertebrates. *Front. Neuroendocrinol.* 28, 143-160, 2007.
540. Tamma, G., Klussmann, E., Maric, K., Aktories, K., Svelto, M., Rosenthal, W., Valenti, G., Rho inhibits cAMP-induced translocation of aquaporin-2 into the apical membrane of renal cells. *Am. J. Physiol.* 281, F1092-F1101, 2001.
541. Tamma, G., Klussmann, E., Oehlke, J., Krause, E., Rosenthal, W., Svelto, M., Valenti, G., Actin remodeling requires ERM function to facilitate AQP2 apical targeting. *J. Cell. Sci.* 118, 3623-3630, 2005.
542. Tamma, G., Klussmann, E., Procino, G., Svelto, M., Rosenthal, W., Valenti, G., cAMP-induced AQP2 translocation is associated with RhoA inhibition through RhoA phosphorylation and interaction with RhoGDI. *J. Cell Sci.* 116, 1519-1525, 2003.
543. Tamma, G., Procino, G., Strafino, A., Bononi, E., Meyer, G., Paulmichl, M., Formoso, V., Svelto, M., Valenti, G., Hypotonicity induces aquaporin-2 internalization and cytosol-to-membrane translocation of ICIn in renal cells. *Endocrinology.* 148, 1118-1130, 2007.
544. Tan, FI., Lolait, SJ., Brownstein, MJ., Saito, N., MacLeod, V., Baeyens, DA., Mayeux, PR., Jones, SM., Cornett, LE., Molecular cloning and functional characterization of a vasotocin receptor subtype that is expressed in the shell gland and brain of the domestic chicken. *Biol. Reprod.* 62, 8-15, 2000.
545. Tanaka, K., Goto, K., Yoshioka, T., Terao, T., Koha, O., Changes in the plasma concentration of immunoreactive arginine vasotocin during oviposition in the domestic fowl. *Brit. Poultry Sci.* 25, 589-595, 1984.

546. Tanii, H., Hasegawa, T., Hirakawa, N., Suzuki, M., Tanaka, S., Molecular and cellular characterization of a water-channel protein, AQP-h3, specifically expressed in the frog ventral skin. *J. Membr. Biol.* 188, 43-53, 2002.
547. Tanious, FA., Veal, JM., Buczak, H., Ratmeyer, LS., Wilson, WD., DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry.* 31, 3103-3112, 1992.
548. Taylor, AA., Davis, JO., Breitenbach, RP., Hartroft, PM., Adrenal steroid secretion and a renal-pressor system in the chicken (*Gallus domesticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 14, 321-333, 1976.
549. Teidelbaum, I., Strasheim, A., AVP stimulates adenylyl cyclase and phospholipase C in reciprocal fashion in cultured RIMCT cells. *Am. J. Physiol.* 259, C693-C696, 1990.
550. Terada, Y., Marumo, F., Recent advances in vasopressin receptors and signal transduction system. *Nippon. Rinsho.* 51, 2655-2660, 1993.
551. Terada, Y., Tomita, K., Nonoguchi, H., Yang, T., Marumo, F., Different localization and regulation of two types of vasopressin receptor messenger RNA in microdissected rat nephron segments using reverse transcription polymerase chain reaction. *J. Clin. Invest.* 92, 2339-2345, 1993.
552. Terris, J., Ecelbarger, C. A., Marples, D., Knepper, M. A., Nielsen, S., Distribution of aquaporin-4 water channel expression within rat kidney. *Am. J. Physiol.* 269, F775-F785, 1995.
553. Terris, J., Ecelbarger, C. A., Nielsen, S., Knepper, MA., Long-term regulation of four renal aquaporins in rats. *Am. J. Physiol.* 271, F414-F422, 1996.
554. Thibonnier, M., Berti-Mattera, LN., Dulin, N., Conarty, DM., Mattera, R., Signal transduction pathways of the human V1-vascular, V2-renal, V3-pituitary vasopressin and oxytocin receptors. *Prog. Brain. Res.* 119, 147-161, 1998.
555. Toop, T., Donald, JA., Comparative aspects of natriuretic peptide physiology in non-mammalian vertebrates: a review. *J. Comp. Physiol.* 174, 189-204, 2004.
556. Toshimori, H., Toshimori, K., Minamino, N., Kangawa, K., Oura, C., Matsukura, S., Matsuo, H., Chicken atrial natriuretic peptide (chANP) and its secretion. *Cell. Tissue Res.* 259, 293-298, 1990.
557. Trajanovska, S., Donald, JA., Molecular cloning of natriuretic peptides from the heart of reptiles: loss of ANP in diapsid reptiles and birds. *Gen. Comp. Endocrinol.* 156, 339-346, 2008.
558. Trajanovska, S., Inoue, K., Takei, Y., Donald, JA., Genomic analyses and cloning of novel chicken natriuretic peptide genes reveal a new insights into natriuretic peptide evolution. *Peptides.* 28, 2155-2163, 2007.
559. Tsukaguchi, H., Shayakul, C., Berger, UV., Mackenzie, B., Devidas, S., Guggino, WB., van Hoek, AN., Hodiger, MA., Molecular characterization of a broad selectivity neutral solute channel. *J. Biol. Chem.* 273, 24737-24743, 1998.
560. Uchiyama, M., Sites of action of arginine vasotocin in the nephron of the bullfrog kidney. *Gen. Comp. Endocrinol.* 94, 366-373, 1994.

561. Umenishi, F., Schrier, RW., Hypertonicity-induced aquaporin-1 (AQP1) expression is mediated by the action of MAPK pathways and hypertonicity-response element in the AQP1 gene. *J. Biol. Chem.* 278, 15765-15770, 2003.
562. Umenishi, F., Verbavatz, JM., Verkman, AS., cAMP regulated membrane diffusion of a green fluorescent protein-aquaporin 2 chimera. *Biophys. J.* 78, 1024-1035, 2000.
563. Valenti, G., Hugon, JS., Bourguet, J., To what extent is microtubular network involved in antidiuretic response? *Am. J. Physiol.* 255, F1098-F1106, 1988.
564. Valenti, G., Procino, G., Liebenhoff, U., Frigeri, A., Benedetti, P. A., Ahnert-Hilger, G., Nurnberg, B., Svelto, M., Rosenthal, W., A heterotrimeric G protein of the G<sub>i</sub> family is required for cAMP-triggered trafficking of aquaporin2 in kidney epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 273, 22627-22634, 1998.
565. Valenti, G., Procino, G., Carmosino, M., Frigeri, A., Mannucci, R., Nicoletti, I., Svelto, M., The phosphatase inhibitor okadaic acid induces AQP2 translocation independently from AQP2 phosphorylation in renal collecting duct cells. *J. Cell. Sci.* 113, 1985-1992, 2000.
566. Valenti, G., Procino, G., Tamma, G., Carmosino, M., Svelto, M., Minireview: aquaporin 2 trafficking. *Endocrinology.* 146, 5063-5070, 2005.
567. Van Balkom, BWM., Van Raak, M., Breton, S., Pastor-Soler, N., Bouley, R., Van der Sluijs, P., Brown, D., Deen, PMT., Hypertonicity is involved in redirecting the aquaporin-2 water channel into the basolateral, instead of the apical, plasma membrane of renal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 278, 1101-1107, 2002.
568. Van Belle, H., Is there a role for cAMP and adenylyl cyclase ? *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 7 Suppl. 5, S28-S32, 1985.
569. Vena, VE., Lac, TH., Wideman, RF. Jr., Dietary sodium, glomerular filtration rate autoregulation, and glomerular size distribution profiles in domestic fowl (*Gallus gallus*). *J. Comp. Physiol. B.* 160, 7-16, 1990.
570. Verbavatz, JM., Brown, D., Sabolic, I., Valenti, G., Ausiello, DA., van Hoeck, AN., Ma, T., Verkman, AS., Tetrameric assembly of CHIP water channels in liposomes and cell membranes: a freeze-fracture study. *J. Cell. Biol.* 123, 605-618, 1993.
571. Verkman, AS., More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J. Cell. Sci.* 118, 3225-3232, 2005.
572. Verkman, AS., Mitra, AK., Structure and function of aquaporin water channels. *Am. J. Physiol.* 278, F13-F28, 2000.
573. Voigt, K., Endokrines System. In: *Lehrbuch der Physiologie*, 4. Ausgabe (Eds: Klinke, R., Silbernagel, S.), Thieme Verlag Stuttgart, 443-492, 2003.
574. Volmert, RF., Firman, JD., Response to angiotensin II after selective lesioning of brain regions believed to be involved in water intake regulation. *Poult. Sci.* 71, 1073-1078, 1992.
575. Wade, JB., Dynamics of apical membrane responses to ADH in amphibian bladder. *Am. J. Physiol.* 257, R998-R1003, 1989.
576. Wade, JB., Kachadorian, WA., Cytochalasin B inhibition of toad bladder apical membrane responses to ADH. *Am. J. Physiol.* 255, C526-C530, 1988.

577. Wade, JB., Stetson, DL., Lewis, SA., ADH action: evidence for a membrane shuttle mechanism. *Ann. NY. Acad. Sci.* 372, 106-117, 1981.
578. Waibl, H., Sinowatz, F., Harn- und Geschlechtsapparat. In: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*, Band 5, 2. Aufl. (Eds: Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E.), Verlag Parey, Berlin, Hamburg. 248-261, 1992.
579. Wall, SM., Han, JS., Chou, CL., Knepper, MA., Kinetics of urea and water permeability activation by vasopressin in rat terminal IMCD. *Am. J. Physiol.* 262, F989-F998, 1992.
580. Walz, T., Hirai, T., Murata, K., Heymann, JB., Mitsuoka, K., Fujiyoshi, Y., Smith, BL., Agre, P., Engel, A., The three-dimensional structure of aquaporin-1. *Nature*, 387, 624-627, 1997.
581. Warburg, MR., Hormonal effect on the osmotic, electrolyte and nitrogen balance in terrestrial amphibia. *Zool. Sci.* 12, 1-11, 1995.
582. Warne, JM., The role of arginine vasotocin in teleost fish osmoregulation. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 54, 83-95, 2002.
583. Warui, CN., King, AS., Stereological observations on the kidney of the domestic fowl. *J. Anat.* 142, 129-139, 1985.
584. Watrous, WM., May, DG., Fujimoto, JM., Mechanism of the renal tubular transport of morphine and morphine ethereal sulfate in the chicken. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 172, 224-229, 1970.
585. Wells, A., Anderson, WG., Hazon, N., Development of an *in situ* perfused kidney preparation for elasmobranch fish: action of arginine vasotocin. *Am. J. Physiol.* 282, R1636-R1642, 2002.
586. Wideman, RF., Jr., Avian kidney anatomy and physiology. *CRC Critical Rev. Poultry Biol.* 2, 133-176, 1988.
587. Wideman, RF. Jr., Braun, EJ., Stimulation of avian renal phosphate secretion by parathyroid hormone. *Am. J. Physiol.* 241, F263-F272, 1981.
588. Wideman, RF. Jr., Braun, EJ., Anderson, GL., Microanatomy of the renal cortex in the domestic fowl. *J. Morphol.* 168, 249-267, 1981.
589. Wideman, RF. Jr., Glahn, RP., Bottje, WG., Holmes, KR., Use of thermal pulse decay system to assess renal blood flow during reduced renal arterial perfusion pressure. *Am. J. Physiol.* 262, R90-R98, 1992.
590. Wideman, RF. Jr. Gregg, CM., Model for evaluating avian renal hemodynamics and glomerular filtration rate autoregulation. *Am. J. Physiol.* 254, R925-R932, 1988.
591. Wideman, RF. Jr., Nishimura H., Bottje, WG., Glahn, RP., Reduced renal arterial perfusion pressure stimulates renin release from domestic fowl kidneys. *Gen. Comp. Endocrinol.* 89, 405-414, 1993.
592. Wideman, RF. Jr, Satnick, JL., Physiological evaluation of diuresis in commercial broiler breeders. *Brit. Poult. Sci.* 30, 313-326, 1989.
593. Williams, GR., Nicholson, JK., The histology and fine structure of the ureter of the starling (*Sturnus vulgaris*). *J. Anat.* 136, 585-594, 1983.
594. Wilson, JX., The renin-angiotensin system in nonmammalian vertebrates. *Endocr. Rev.* 5, 45-61, 1984.

595. Wilson, JX., The renin-angiotensin system in birds. In: Progress in Avian Osmoregulation (Eds: Hughes, MR., Chadwick, A.), Leeds Philosophical and Literary Society, Leeds, United Kingdom. 61-79, 1989.
596. Wolbach, RA., Renal regulation of acid-base balance in the chicken. *Am. J. Physiol.* 181, 149-158, 1955.
597. Wong, W., Scott, JD., AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5, 959-970, 2004.
598. Xu, DL., Martin, PY., Ohara, M., St. John, J., Pattison, T., Meng, X., Morris, K., Kim, JK., Schrier, RW., Upregulation of aquaporin-2 water channel expression in chronic heart failure rat. *J. Clin. Invest.* 99, 1500-1505, 1997.
599. Yamamoto, T., Sasaki, S., Aquaporins in the kidney: emerging new aspects. *Kidney Internat.* 54, 1041-1051, 1998.
600. Yamamoto, T., Sasaki, S., Fushimi, K., Ishibashi, K., Yaoita, E., Kawasaki, K., Marumo, F., Kihara, I., Vasopressin increases AQP-CD water channel in apical membrane of collecting duct cells in Brattleboro rats. *Am. J. Physiol.* 268, C1546-C1551, 1995.
601. Yang, Y., Cui, Y., Fan, Z., Cook, GA., Nishimura, H., Two distinct aquaporin-4 cDNAs isolated from medullary cone of quail kidney. *Comp. Biochem. Physiol.* 147, 84-93, 2007.
602. Yang, Y., Cui, Y., Wang, W., Zhang, L., Bufforf, L., Sasaki, S., Fan, Z., Nishimura, H., Molecular and functional characterization of a vasotocin-sensitive aquaporin water channel in quail kidney. *Am. J. Physiol.* 287, R915-R924, 2004.
603. Yang, Y., Nishimura, H., Molecular and functional characterization of aquaporin 1 in Japanese quail kidneys. *FASEB. J.* 20, 905, 2007.
604. Yasuda, G., Jeffries, WB., Regulation of cAMP production in initial and inner medullary collecting ducts. *Kidney. Internat.* 54, 80-86, 1998.
605. Yasui, M., Hazama, A., Kwon, TH., Nielsen, S., Guggino, WB., Agre, P., Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin. *Nature.* 402, 184-187, 1999a.
606. Yasui, M., Kwon, T., Knepper, MA., Nielsen, S., Agre, P., Aquaporin-6: an intracellular vesicle water channel protein in renal epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 5808-5813, 1999b.
607. Yasui, M., Zelenina, SM., Celsi, G., Aperia, A., Adenylate cyclase-coupled vasopressin receptor activates AQP2 promoter via a dual effect on CRE and AP1 elements. *Am. J. Physiol.* 272, F443-F450, 1997.
608. Yip, KP., Coupling of vasopressin-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and apical exocytosis in perfused rat kidney collecting duct. *J. Physiol.* 538, 891-899, 2002.
609. Yokota, SD., Benyajati, S., Dantzler, WH., Comparative aspects of glomerular filtration in vertebrates. *Renal Physiol.* 8, 193-221, 1985.
610. Yool, AJ., Aquaporins: multiple roles in the central nervous system. *Neuroscientist* 13, 470-485, 2007.

611. Yoshimura, K., Sugiura, K., Ohmori, Y., Aste, N., Saito, N., Immunolocalization of aquaporin-4 in the brain, kidney, skeletal muscle, and gastro-intestinal tract of chicken. *Cell Tissue Res.* 344,51-61, 2011.
612. Zaccolo, M., Pozzan, T., Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. 295, 1711-1715, 2002.
613. Zelenina, M., Christensen, BM., Nielsen, S., Aperia, A., Prostaglandin E2 interaction with arginine vasopressin (AVP): Effects on aquaporin (AQP) 2 abundance in membrane and the state of AQP2 phosphorylation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9, 29A, 1998.
614. Zwingmann, W., Topographie und Histologie des harnbereitenden und harnabführenden Systems der Niere des Haushuhnes. *Diss. Med. Vet. Hannover*, 1973.

## 7. KAPITEL Abkürzungsverzeichnis

*	signifikant (p<0,05)
**	signifikant (p<0,01)
***	signifikant (p<0,001)
A	Arteria
Abb	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
ACE	angiotensin converting enzyme
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
ADH	antidiuretisches Hormon
Ag	Antigen
Ag-Ak-Komplex	Antigen-Antikörper Komplex
Ak	Antikörper
AKAP	A-Kinaseankerprotein
ALDO	Aldosteron
ANG I + II	Angiotensin I und II
ANP	atrialess natriuretisches Peptid
AQP	Aquaporin
AQP-TB	AQP der Krötenharnblase
AS	Aminosäure
AT	DNA-Region und gleichzeitig Bindungsstelle des DAPI
ATP	Adenosintriphosphat
AVP	Arginin Vasopressin
[ <sup>3</sup> H]AVP	tritiertes AVP
AVT	Arginin Vasotocin
B	spezifisch gebundener Ligand
BAPTA	bis-(o-aminophenoxy)- ethane-N,N,N,N-tetraaceticacid
B <sub>max</sub>	maximal number of binding sites
BNP	brain natriuretisches Peptid
BSA	bovines Serum Albumin

## Kapitel 7: Abkürzungsverzeichnis

CA	Carboanhydrase
C <sub>H</sub>	konstanter Teil der H-Kette des AK
C <sub>L</sub>	konstanter Teil der L-Kette des AK
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guaninmonophosphat
CHIP	channel-forming integral protein
cMK	corticaler Markkegel
CNP	C-Typ natriuretisches Peptid
cpm	counts per minute
CR	<i>Cortex renalis</i>
CREB	cAMP responsive element binding protein
cSR	corticales Sammelrohr
Cy3	rotfluoreszierendes Carbocyanin
Cys	Cystein
Cys-181	Cysteinrest 181
DAPI	4',6-Diamidino-2-Diphenyl-Indoldilaktat, Kernfärbung
dDAVP	desamino-8-D-Arginin-Vasopressin
DI	<i>Diabetes insipidus</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpm	decays per minute
DT	distaler Tubulus
E.coli	Escherischia coli
ELISA	enzyme-linked immunosorbent-assay
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERM	Erzin-Radixin-Moesin
EZV	extrazelluläres Flüssigkeitsvolumen
EZT	extrazelluläre Tonizität
F	Konzentration des freien Radioliganden
F <sub>ab</sub>	fragment antigen binding
F-Aktin	filamentöse Form der Aktinfilamente
F <sub>c</sub>	fragment crystallizable

## Kapitel 7: Abkürzungsverzeichnis

G-Aktin	globuläre Form der Aktinfilamente
GB	Gesamtbindung
GDI	Guanin-dissoziations-Inhibitoren
GEZs	Granulär-epitheloide Zellen
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GlpF	Glycerol uptake facilitator protein
Go-Zellen	Goormaghtichtzellen
GP	C-terminales Glycopeptid
G <sub>i</sub>	G-Protein (inhibiert)
G <sub>s</sub>	G-Protein (stimuliert)
GTP	Guanintriphosphat
(H)-Ketten	schwere Ketten des Antikörpermoleküls
H89	spezifischer PKA Inhibitor
HCL	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
Hg	Quecksilber
HHL	Hypophysenhinterlappen
Hkt	Hämatokrit
HL	hydrophile Schleife d. AQP
HS	Henlesche Schleife
IBMX	3-Isobuthyl-1-Methylxanthin
IC <sub>50</sub> -Wert	.inhibiting concentration 50%
Ig	Immunglobulin
IMCD	Madin Darby kidney cells
IMPs	intramembranale Partikel
IP <sub>3</sub>	Inositoltrisphosphat
IS	intermediäres Segment
IT	Isotocin
i.v.	intravenös
J <sub>v</sub>	Nettowasserflux
JGA	juxtaglomerulärer Apparat
k <sub>a</sub>	Assoziationsgeschwindigkeitskonstante

## Kapitel 7: Abkürzungsverzeichnis

$k_d$	Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante
$K_D$	Dissoziationsgleichgewichtskonstante
kDa	Kilo Dalton
$K_i$	Verdrängungskonstante
KM	Körpermasse
$L_p$	osmotische Wasserpermeabilität
[L]	Konzentration des Liganden
(L)-Ketten	leichte Ketten des Antikörpermoleküls
LLC-PK1	Zelllinie aus Nierenepithel des Schweines
LLN	loopless Nephron
LN	looped Nephron
[LR]	Konzentration des Ligand-Rezeptor-Komplexes
MAL	Myelin und Lymphozyten assoziiertes Protein
MD	Macula densa
Min	Minute
MIP	major intrinsic protein
MK	Markkegel
mMK	medullärer Markkegel
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
mSR	medulläres Sammelrohr
MT	Mesotocin
MT-Glom	mammalian type Glomerulum
MT-JGA	mammalian type juxtaglomerulärer Apparat
MT-Nephron	mammalian type Nephron
MZM	mesangiale Zellmasse
NaCl	isotone Natriumchloridlösung
NDI	Nephrogener <i>Diabetes insipidus</i>
NHS	Normal Horse Serum
NP	natriuretisches Peptid
NPA-Box	Domäne des Wasserkanals mit einer Asparagin-Prolin-Alanin-Sequenz
NSB	non-specific-binding,

## Kapitel 7: Abkürzungsverzeichnis

NST	<i>Nucleus striae terminalis</i>
NTS-Motiv	Asparagin-Threonin-Serin Motiv des AQP2
OT	Objekträger
P	phosphoryliert
Paa	<i>Pars ascendens ansae</i>
PAH	p-Aminohippursäure
pAk	Primärantikörper
PB	0,1 molarer Phosphatpuffer
pCREB	phosphoryliertes cAMP-responsive element binding protein
Pda	<i>Pars descendens ansae</i>
PDE	Phosphodiesterase
PEI	Polyethylenimin
PEG	Polyethylenglycol
PFA	Paraformaldehyd-Lösung
PIP	Präinkubationspuffer
PKA, -C, -D	Proteinkinase A, -C, -D
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PT	proximaler Tubulus
PVN	<i>Nucleus paraventricularis</i>
qAQP2	Aquaporin-2 der Wachtel
R	Zahl der Rezeptoren
$r^2$	Korrelationskoeffizient
$R_0$	molare Rezeptorkonzentration
[R]	Konzentration des freien Rezeptors
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RhoA	Unterfamilie der Rho-GTPasen
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
RRA	Radiorezeptorassay
RT	Raumtemperatur
RT-Glom	reptilian-type Glomerulum

## Kapitel 7: Abkürzungsverzeichnis

RT-JGA	reptilian-type juxtaglomerulärer Apparat
RT-Nephron	reptilian-type-Nephron
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
sAk	Sekundärantikörper
SB	specific binding
SNAP23	tSNARE, Synaptosomen assoziiertes Protein
SNARE	soluble NSF attachment proteinreceptor
SN-GFR	single nephron glomerular filtration rate
SON	<i>Nucleus supraopticus</i>
SP	N-terminales Signalpeptid
SPA1	AQP2-Bindungsprotein
T	maximale Bindung des Liganden
TEPD	transepitheliale Potentialdifferenz
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TM-2	zweite transmembranale Domäne
TO	total binding, Gesamtaktivität
Ton-EBP	tonicity-responsive enhancer binding protein
tSNARE	target membrane-SNARE
V	<i>Vena</i>
V <sub>1</sub>	Vasopressin-Rezeptor des Subtyps 1
V <sub>2</sub>	Vasopressin-Rezeptor des Subtyps 2
V <sub>t</sub>	transepitheliale Spannung
VAMP2	vesicle associated membrane protein 2
V <sub>H</sub> -Domäne	variabler bzw. hypervariabler Bezirk der schweren Kette
V <sub>L</sub> -Domäne	variabler bzw. hypervariabler Bezirk der leichten Kette
VNP	ventrikuläres natriuretisches Peptid
vSNARE	vesicle-SNARE
Vv	<i>Venae</i>
WP	Wasserpermeabilität
ZV	Zentralvene
ZZ	Zellzahl pro Liter

## **8. KAPITEL Anhang**

### **8.1. Publikationen**

#### **8.1.1. Wissenschaftliche Veröffentlichungen**

Mütze, K., Reuter, B., Gerstberger, R., Vasotocin induced cellular translocation of aquaporin-2 water channels in collecting ducts of the chicken kidney. *General and Comparative Endocrinology*: in preparation.

#### **8.1.2. Veröffentlichte Abstrakte**

Mütze, K., Reuter, B., Gerstberger, R., Vasotocin induced cellular translocation of aquaporin-2 water channels in collecting ducts of the chicken kidney. *Leipziger Blaue Hefte* 4: Proceedings 18. Tagung der DVG-Fachgruppe Physiologie und Biochemie, 92, 2008.

#### **8.1.3. Nichtveröffentlichte Abstrakte**

Esser, K., Gerstberger, R., Vasotocin induced cellular translocation of aquaporin-2 water channels in collecting ducts of the chicken kidney. Proceedings 17. Tagung der DVG-Fachgruppe Physiologie und Biochemie, 2006.

## 8.2. Danksagung

Vorneweg möchte ich unserem Chef und meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger zum einen für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Doktorarbeit in seinem Institut und zum anderen für seine Art der Betreuung, das Einarbeiten in die Hintergründe sowohl der inhaltlichen als auch methodischen Thematik und zu guter Letzt seiner menschlichen Art, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit (auch über größere räumliche Instanzen hinweg) beigetragen hat, danken.

Desweiteren gilt mein besonderer Dank Bärbel Reuter, die mich in der Einführung der verschiedenen Versuchsprotokolle exzellent unterstützt hat und mit ihrer fröhlichen Art sowie ihrem Organisationstalent zu einem angenehmen Arbeitsklima in unserem „kleinen Team“ beigetragen hat. Nicht zu vergessen die Versorgung mit diversen Verköstigungen während der -meist kurzen-Mittagspausen.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. Roth und Daniela Ott für das fortwährende Interesse an dieser Arbeit und die aufmunternde Unterstützung in jeglicher Art und Weise. Herrn Michael Haas danke ich für die sorgfältige Pflege der Versuchstiere und die kleinen „Ablenkungen“ am Rande.

Allen Doktoranden und Mitarbeitern des Instituts danke ich herzlich für die angenehme Atmosphäre während der Arbeit, Mittagspausen sowie diversen Feiern.

Desweiteren an dieser Stelle ein großes Dankeschön an meinen Mann, der mich zu Beginn meiner Arbeit geduldigst in das Bildbearbeitungsprogramm einwies und mir mit vollstem Verständnis für die Arbeit zur Seite stand. Vielen Dank! Gleichzeitig bedanke ich mich bei ihm sowie dem gesamten Praxisteam für deren Flexibilität und Spontanität, die die Durchführung der Endkorrektur sowie die letzten Besuche in Giessen überhaupt erst ermöglichten. Ihr seid Klasse!

Mit der größte Dank gebührt meinen Eltern, die mich während des Studiums und der Promotion in jeglicher Hinsicht unterstützt haben.

### 8.3. Erklärung

Ich erkläre:

„Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Kerstin Mütze



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5820-3



9 783835 958203