

PDF hosted at the Radboud Repository of the Radboud University Nijmegen

The following full text is a publisher's version.

For additional information about this publication click this link.

<http://hdl.handle.net/2066/22589>

Please be advised that this information was generated on 2017-12-05 and may be subject to change.

Nieuwe inzichten in de moleculaire oorzaken van nefrogene diabetes insipidus

N.V.A.M. KNOERS, A.F. VAN LIEBURG, B.A. VAN OOST, C.H. VAN OS, P.M.T. DEEN EN L.A.H. MONNENS

SAMENVATTING

Nefrogene diabetes insipidus (NDI) is een zeldzame erfelijke nierziekte gekarakteriseerd door ongevoeligheid van het distale nefron voor het antidiuretisch effect van arginine-vasopressine. In de afgelopen jaren zijn twee verschillende genetische defecten voor deze aandoening ontdekt. Mutaties in het gen dat codeert voor de vasopressine type 2 (V_2)-receptor zijn verantwoordelijk voor de geslachtsgebonden recessieve vorm van NDI, terwijl mutaties in het gen voor het vasopressine-afhankelijke waterkanaal aquaporine-2 ten grondslag liggen aan de autosomaal recessieve vorm van de ziekte. De detectie en analyse van natuurlijk voorkomende mutaties in deze genen hebben het inzicht in de biologische functie en de relatie tussen de structuur en functie van de V_2 -receptor en het aquaporine-2-waterkanaal verruimd, en daarmee het begrip van de celfysiologische processen die ten grondslag liggen aan het concentrerend vermogen van de nier vergroot. Tevens hebben deze bevindingen geleid tot een verbetering van de diagnostische mogelijkheden en erfelijkheidsadvisering bij NDI.

SUMMARY

Nephrogenic diabetes insipidus (NDI) is a rare genetic renal disorder characterized by insensitivity of the distal renal nephron to the antidiuretic effect of arginine vasopressin. In recent years two different genetic defects underlying the disease have been identified. Mutations in the gene encoding for the vasopressin type-2 (V_2) receptor cause the X-chromosomal form of the disease, whereas mutations in the gene encoding for the vasopressin-dependent water channel aquaporin-2 are responsible for the autosomal recessive type of the disease. The identification and analysis of naturally occurring mutations in the V_2 receptor and the aquaporin-2 water channel have increased the insight into the structure-function correlates of both proteins and thus have led to a substantial progress in understanding the cellular mechanisms underlying the concentrating ability of the kidney. In addition, these findings have considerable impact on diagnosis and genetic counseling of NDI.

INLEIDING

Congenitale nefrogene diabetes insipidus (NDI) is een zeldzame erfelijke nierziekte waarbij het distale nefron ongevoelig is voor het uit de neurohypofyse afkomstige antidiuretische hormoon arginine-vasopressine (AVP). Als gevolg daarvan verliest de nier zijn concentrerend vermogen en produceert grote hoeveelheden hypotone urine (50-100 mosmol/kg water), hetgeen kan leiden tot ernstige dehydratie en elektrolytverstoreningen. De meest kenmerkende symptomen van

het ziektebeeld zijn polyurie en polydipsie. In het eerste levensjaar worden deze verschijnselen niet snel herkend en staan specifieke symptomen zoals prikkelbaarheid, anorexie, braken, groeiachterstand, koorts, obstipatie, en ontwikkelingsachterstand op de voorgrond.¹ De diagnose wordt daarom vaak pas gesteld wanneer bij routine-laboratoriumonderzoek een hypernatriëmie wordt gevonden. Na het eerste levensjaar vallen polyurie en polydipsie meer op. Polyurie kan in enkele gevallen leiden tot dilatatie van het urinewegsysteem. Een andere belangrijke complicatie van NDI, die vooral in de oudere literatuur veelvuldig wordt beschreven, is mentale retardatie. Algemeen wordt aangenomen dat dit het gevolg is van ernstige dehydratie van de hersenen in de eerste levensjaren. In een recente psychometrische studie is aangetoond dat de huidige prevalentie van mentale retardatie onder NDI-patiënten aanzienlijk lager is dan in de literatuur wordt gesuggereerd.² Mogelijk is dit het gevolg van vroegere herkenning en betere behandeling van de aandoening. NDI is een genetisch heterogene ziekte. In de meerderheid van de gevallen erft de aandoening geslachtsgebonden recessief over. In een aantal families vertoont NDI echter een niet-geslachtsgebonden overerving. Zowel autosomaal recessieve als autosomaal dominante overervingspatronen zijn beschreven. Recent werden de gendefecten ontdekt behorend bij de geslachtsgebonden vorm en bij een autosomaal recessieve vorm.³⁻⁶ Deze bevindingen hebben niet alleen geleid tot een verbetering van de diagnostische mogelijkheden en erfelijkheidsadvisering van NDI maar ook, en vooral, tot een beter begrip van de basale celfysiologische processen die ten grondslag liggen aan het concentrerend vermogen van de nier.

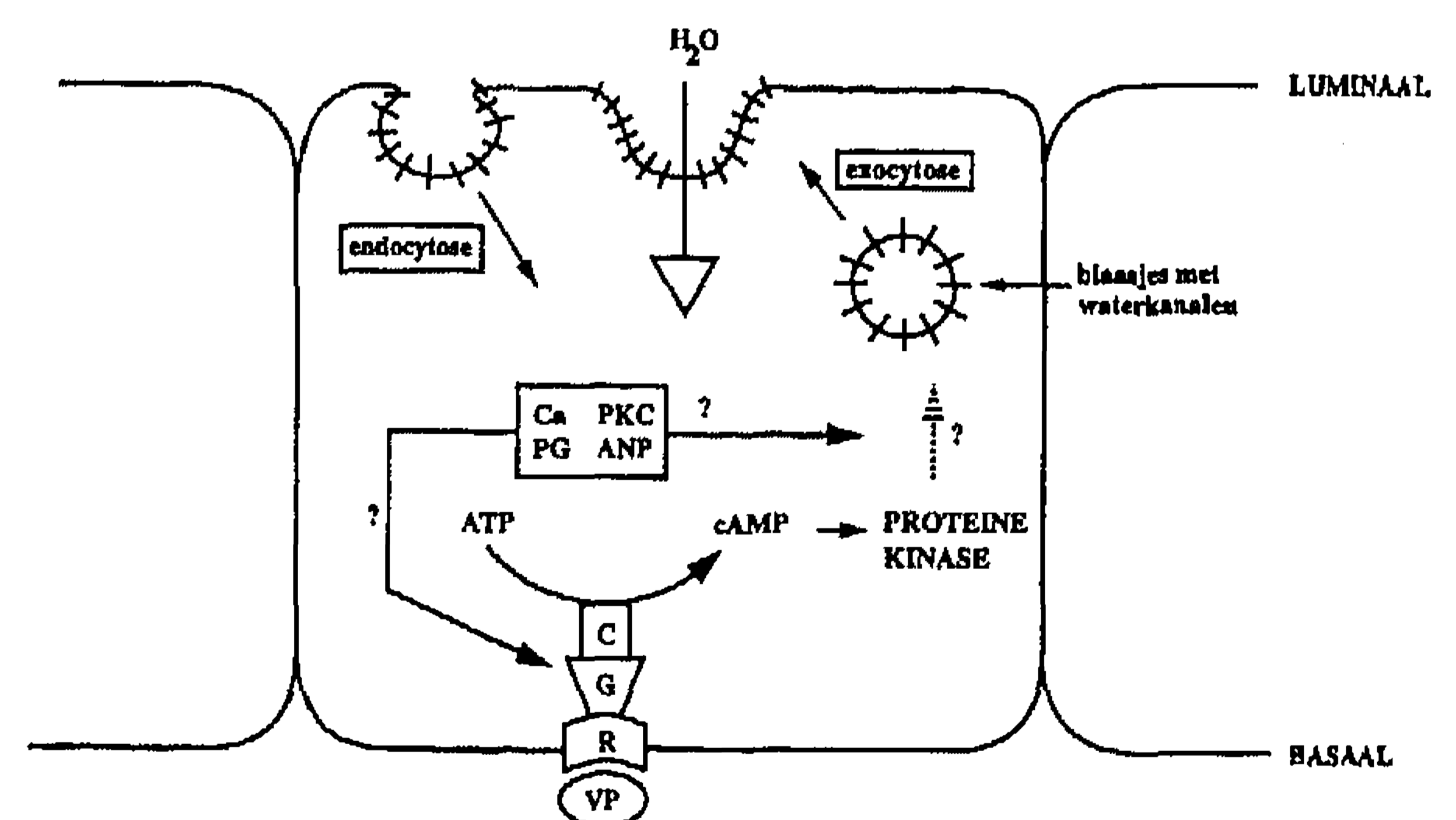


Fig. 1. Model van de cellulaire processen betrokken bij de antidiuretische werking van vasopressine in de verzamelbuizen van de nier. VP: vasopressine; R: V_2 -receptor; G: stimulerend G-eiwit; C: catalytische subunit van adenylaacyclase; PKC: proteïnekinase C; PG: prostaglandines; ANP: atriale natriuretische factor.

In dit artikel geven wij een overzicht van recente inzichten in de renale werking van AVP en de moleculaire oorzaken van NDI.

DE WERKING VAN AVP IN DE NIER

AVP wordt uitgescheiden door de neurohypofyse wanneer de serumosmolaliteit stijgt en als reactie op hypovolemie. In de nier bindt het hormoon aan specifieke receptoren in de basolaterale membraan van de cellen in het laatste gedeelte van de distale tubulus en de verzamelbuis (fig. 1). Stimulatie van deze vasopressine type 2-receptoren heeft een stijging van cyclisch AMP (cAMP) tot gevolg, een eigenschap waardoor deze receptoren, reeds lang voordat hun moleculaire structuur was opgehelderd, onderscheiden werden van de vasopressine type I-receptoren. In 1992 werd door Birnbaumer et al. de DNA-structuur van het humane V_2 -receptorgen opgehelderd.⁷ Vertaling van

de DNA-code resulteert in een receptoreiwit van 371 aminozuren met een molecuulgewicht van 41.000. De V_2 -receptor heeft de algemene structuur van G-eiwit gekoppelde receptoren, bestaande uit 7 transmembraandomeinen van 20-25 hydrofobe residuen, verbonden door intracellulaire en extracellulaire lussen (fig. 2). De interactie van AVP met de V_2 -receptor induceert de activatie van adenylaat-cyclase en de stijging van cAMP via tussenkomst van een stimulerend G-eiwit. cAMP initieert vervolgens een aantal opeenvolgende, gedeeltelijk nog onbekende, intracellulaire stappen, die uiteindelijk leiden tot fusie van intracellulaire blaasjes, waarvan de membranen waterkanalen bevatten, met de lumenale membraan. Hierdoor neemt de waterpermeabiliteit van de lumenale membraan toe en kan door de osmotische werking van het hypertone interstitium van het niermerg water vanuit het tubuluslumen geresorbeerd worden. Uiteindelijk resulteert dit in de vorming van geconcentreerde uri-

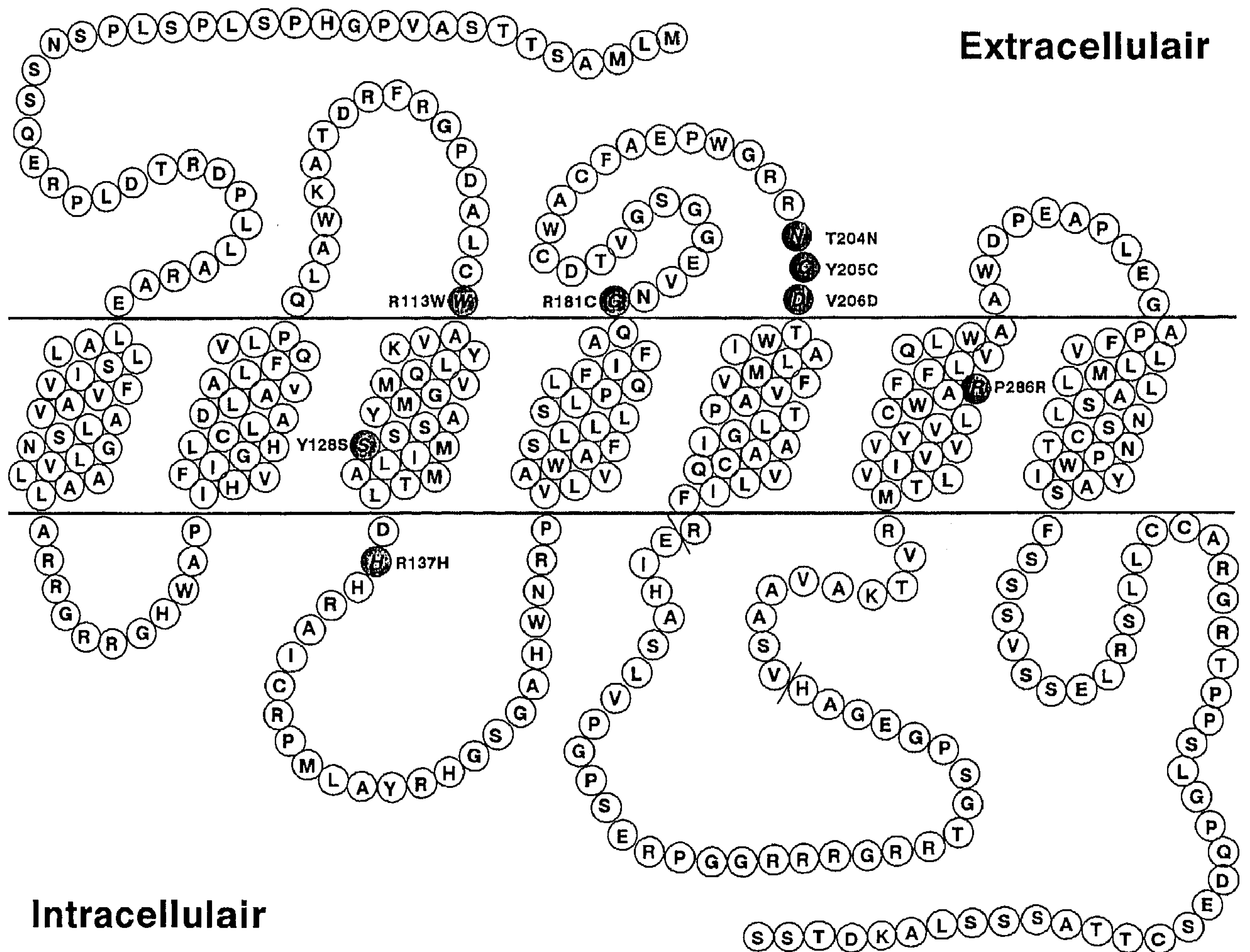


Fig. 2. Model van de vasopressine V_2 -receptor en lokatie van de de 10 mutaties waarvan het effect op de functie van de receptor met *in vitro*-expressie is bestudeerd. De grijze symbolen geven de aminozuursubstituties aan; dunne strepen in het derde intracellulaire domein geven de 'frameshift'-mutaties aan.

ne. De waterkanalen blijven in de lumenale membraan aanwezig zolang stimulatie door AVP plaatsvindt. Wanneer deze wegvalt treedt endocytose van de waterkanalen op en vermindert de waterreabsorptie. Dit mechanisme van exo- en endocytose van blaasjes wordt 'membrane shuttling' genoemd.

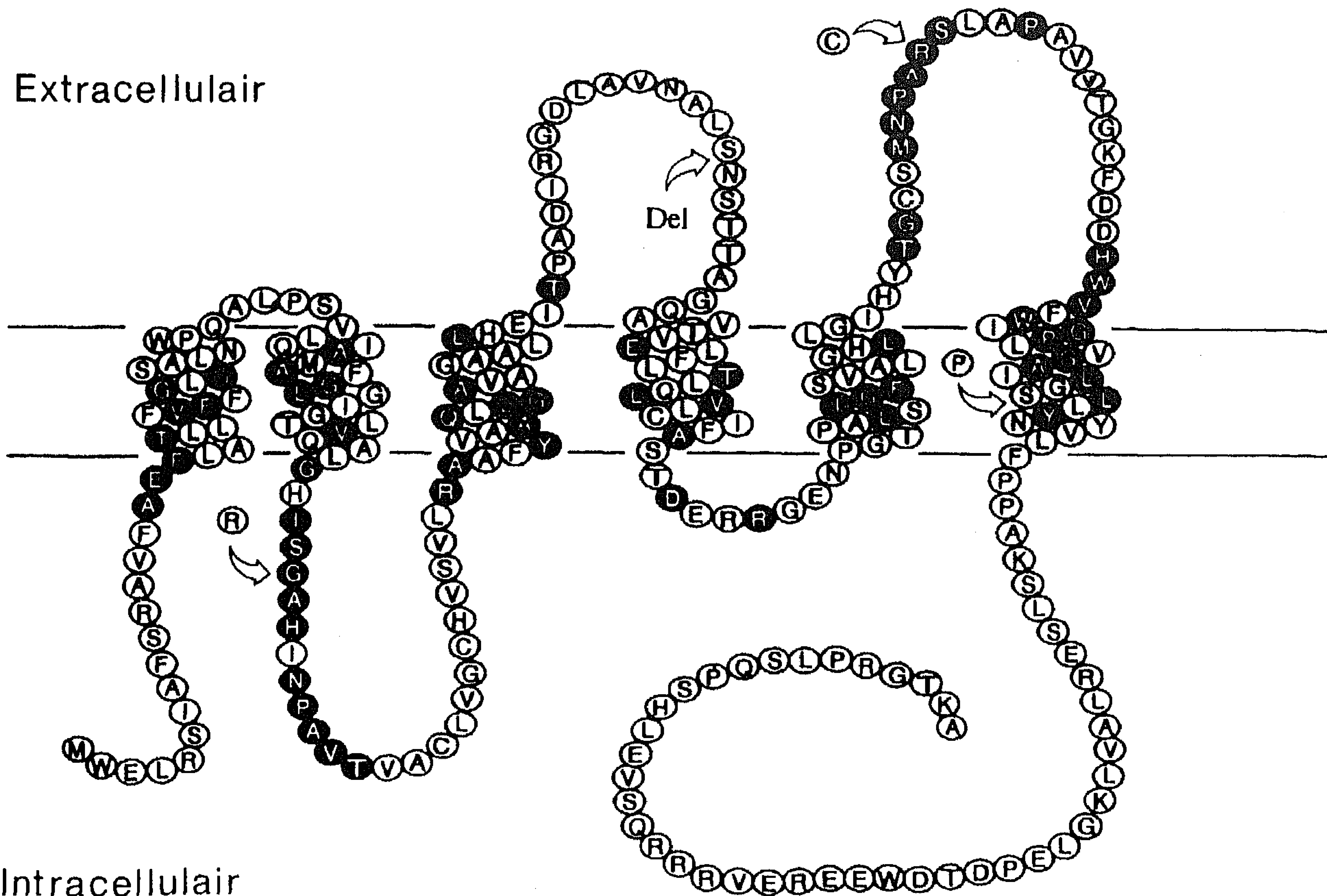
Tot voor kort was de moleculaire structuur van deze waterkanalen onbekend. In 1993 identificeerden Fushimi et al. een waterkanaaleiwit in de lumenale membraan van de verzamelbuiscellen van de rattenier.⁸ Dit eiwit behoort tot een familie van membraaneiwiitten, de aquaporines, die functioneren als selectieve watertransporteurs in planten en zoogdieren. Bij zoogdieren zijn inmiddels 5 verschillende aquaporines geïdentificeerd. De aquaporines 1, 2, en 3 komen zeer hoog tot expressie in de nier. Op grond van de exclusieve lokalisatie van het door de groep van Fushimi gevonden waterkanaaleiwit aquaporine 2 in de lumenale membraan van de verzamelbuiscellen, postuleerden zij dat dit het vasopressine-afhankelijke waterkanaal is. Deze hypothese werd ondersteund door de bevinding dat dehydratie en chronische AVP-infusie bij ratten een toename van de aquaporine-expressie in het niermerg teweegbrengen.^{9,10} Na de ontdekking van het aquaporine 2-gen bij de rat volgde de klonering van de humane homoloog, die zich op chromosoom 12 bleek te bevinden.⁶

GESLACHTS-GEBONDEN NEFROGENE DIABETES INSIPIDUS

Sedert eind jaren '80 werd door de meeste onderzoekers aangenomen dat het defect bij geslachtsgebonden NDI op het niveau van de V₂-receptor gelegen is. Deze hypothese was gebaseerd op receptorstudies bij NDI-patiënten waarbij gebruik werd gemaakt van de V₂-receptoragonist 1-deamino-8-D-arginine-vasopressine (DDAVP). DDAVP heeft naast antidiuretische werking ook een aantal extrarenale effecten, namelijk vaatverwijding en een verhoging van de bloedspiegels van een aantal stollingsfactoren (factor VIII, Von Willebrand-factor) en fibrinolytische factoren (weefsel-type plasminogeenactivator). Bij patiënten met geslachtsgebonden NDI bleven deze extrarenale reacties op DDAVP uit, hetgeen het bestaan van een gegeneraliseerd V₂-receptordefect suggereerde.¹¹ Deze veronderstelling werd ondersteund door genetische studies en functionele expressiestudies. In 1988 werd het gen voor geslachtsgebonden NDI door middel van koppelingsonderzoek met polymorfe DNA-merkgenen gelokaliseerd in het Xq28-gebied, de subtelomere regio van de lange arm van het X-chromosoom.¹² Aangezien het vermoeden bestond dat NDI veroorzaakt werd door een V₂-receptordefect, werden vervolgens ham-

ster-humane hybridecellijnen met verschillende fragmenten van het humane X-chromosoom functioneel getest op de aanwezigheid van het V₂-receptorgen. Alleen cellijnen die het distale deel van de lange arm van het X-chromosoom (Xqter) bevatten vertoonden na toevoeging van AVP aan het medium een toename van cAMP-productie, duidend op V₂-receptoractiviteit.¹³ Deze resultaten vormden een sterke indicatie voor de aanwezigheid van een functioneel gen voor de V₂-receptor in Xqter. De lokalisatie van het V₂-receptorgen stemde overeen met de genetische lokalisatie van het NDI-gen en suggereerde dat het V₂-receptorgen en het NDI-gen identiek zijn. De klonering van het humane V₂-receptor cDNA in 1992 maakte het vervolgens mogelijk het bewijs voor deze hypothese te leveren.⁷ Door drie onderzoeksgroepen werden de eerste mutaties in het V₂-receptorgen bij NDI-patiënten gevonden.³⁻⁵ Inmiddels is het totaal aantal verschillende mutaties dat in de literatuur beschreven is toegenomen tot 64 (overzichten in Knoers¹⁴ en Fujiwara¹⁵). De mutaties zijn niet geclusterd in een bepaalde regio, maar worden verspreid door het hele gen gevonden. De gevonden deleties en inserties van nucleotiden hebben over het algemeen tot gevolg dat de tripletgroepering van het DNA wordt verstoord ('frameshift'), waardoor de verkeerde aminozuren worden ingebouwd en de eiwitsynthese meestal vroegtijdig stopt. Het is dus aannemelijk dat deze mutaties functionele consequenties hebben. Het merendeel van de mutaties in het V₂-receptorgen zijn echter nucleotidesubstituties die resulteren in vervanging van een aminozuur door een ander ('missense'-mutaties). Om na te gaan of deze mutaties inderdaad tot disfunctie van de receptor leiden werd het effect van een aantal van deze mutaties op de receptorfunctie bestudeerd door middel van *in vitro*-expressiestudies. Daarbij werden de natuurlijk voorkomende mutaties experimenteel aangebracht in het normale V₂-receptor-cDNA. Dit gemuteerde cDNA werd in niercellen tot expressie gebracht, waarna de binding van radioactief AVP en de cAMP-productie werden gemeten. Tot op heden zijn op deze wijze 8 'missense' mutaties en tevens twee 'frameshift' mutaties bestudeerd.¹⁶⁻¹⁹ Bij 4 van de 8 'missense' mutaties (Y128S in het derde transmembraandomein, Y205C en V206D in het tweede extracellulaire domein, en P286R in het zesde transmembraandomein) en de twee 'frameshift'-mutaties ('frameshift' na R230 en 'frameshift' na H261 in het tweede intracellulaire domein) werd een totale afwezigheid van *in vitro*-AVP binding-gevonden^{16,17} (fig. 2). Drie mutaties (R113W in het eerste extracellulaire domein, R181C in het tweede extracellulaire domein, en T204N in het tweede extracellulaire domein) hadden geen volledige afwezigheid maar afname van AVP-bin-

Extracellulair



Intracellulair

Fig. 3. Veronderstelde topologie van het aquaporine 2-eiwit. De plaats van de nucleotide deletie (369delC) en de aminozuursubstituties (G64R, R187C, S216P) gevonden bij patiënten met autosomaal recessieve NDI is aangegeven door pijlen. De aminozuren die zijn geconserveerd in de familie van aquaporines zijn aangegeven door de zwart gekleurde symbolen.

ding en cAMP-productie tot gevolg.¹⁶⁻¹⁸ In overeenstemming met deze laatste *in vitro*-resultaten bereikte de patiënt met de T204N-mutatie na een dubbele dosis DDAVP een hogere urineosmolaliteit dan gebruikelijk is voor NDI-patiënten.¹⁷ Bij één 'missense'-mutatie (R137H in het tweede intracellulaire domein, fig. 2) vonden Rosenthal et al. een normale AVP-bindingscapaciteit, maar geen stimulatie van het adenylaatcyclase.¹⁹ Deze bevinding reflecteert vermoedelijk een onvermogen van de gemuteerde receptor om het G-eiwit te activeren. Ondanks het grote aantal verschillende mutaties dat in het V₂-receptorgen is gevonden, zijn er vooralsnog geen duidelijke fenotypische verschillen binnen de groep patiënten met geslachtsgebonden NDI gevonden.

AUTOSOMAAL RECESSIEVE NEFROGENE DIABETES INSIPIDUS

Alhoewel de geslachtsgebonden vorm van NDI veruit de meest voorkomende vorm van NDI is, vertoont ongeveer 10% van de families een niet-geslachtsgebonden overervingspatroon. Bij één patiënt uit een der-

gelijke familie werd bovendien een normale extrarenale reactie (vaatverwijding en stijging van stollingsparameters en fibrinolytische parameters) op toediening van DDAVP waargenomen.²⁰ Dit leidde tot de hypothese dat een postreceptordefect de niet-geslachtsgebonden vorm van NDI veroorzaakt. Deen et al. onderzochten of bij deze patiënt mutaties aanwezig waren in het aquaporine 2-gen.⁶ De patiënt bleek samengesteld heterozygoot te zijn voor twee verschillende puntmutaties (fig. 3): een puntmutatie resulteerde in substitutie van een arginine door een cysteine (R187C) in een van de evolutionair meest geconserveerde regio's van de aquaporine familie, de andere veroorzaakte substitutie van een serine door een proline (S216P) in het zesde transmembraandomein van het waterkanaaleiwit. Deze tweede mutatie verstoort waarschijnlijk de alfa-helix-structuur in dit deel van het transmembraandomein. De ouders van de patiënt waren ieder heterozygoot voor een van de twee mutaties en hadden geen symptomen van de ziekte. Vervolgens werden in drie andere families mutaties in het aquaporine 2-gen gevonden (fig. 3).²¹ In deze families waren de patiënten, die allen consanguïne ou-

ders hadden, homozygoot voor een mutatie. Om na te gaan of mutaties in het aquaporine 2-gen ook inderdaad een niet-functioneel waterkanaal tot gevolg hebben, werd de expressie van de mutante aquaporines bestudeerd in oöcyten van de *Xenopus laevis* (kluwpad). Daartoe werden deze oöcyten, die een hoge translatiecapaciteit bezitten, geïnjecteerd met normaal of mutant aquaporine 2-RNA. De waterpermeabiliteit van oöcyten geïnjecteerd met mutant RNA verschilde niet van die van controle-oöcyten geïnjecteerd met water, terwijl de permeabiliteit van oöcyten geïnjecteerd met normaal aquaporine 2-RNA met een factor 10 toenam. Gelijktijdige injectie van mutant en normaal aquaporine 2-RNA resulteerde in een normale waterpermeabiliteit, hetgeen in overeenstemming is met het ontbreken van symptomen bij heterozygoten en dus met het autosomaal recessieve overervingspatroon dat NDI in de betrokken families vertoonde.^{6,21} Door middel van immunoblot-analyse en immunocytochemie toonden Deen et al. aan dat de afwezigheid van toename in waterpermeabiliteit in oöcyten geïnjecteerd met mutant aquaporine 2-RNAs wordt veroorzaakt door een verminderd transport van de mutante aquaporine 2-eiwitten naar de plasmamembraan.²² De resultaten van deze studies vormden het definitieve bewijs dat aquaporine 2 het vasopressine-afhankelijke waterkanaal is en essentieel voor de concentratie van urine onder invloed van vasopressine.

De recente studie van Van Lieburg et al. bevestigt de hypothese dat de aanwezigheid van een normale extrarenale respons op DDAVP geëxtrapoleerd mag worden naar andere patiënten met aquaporine 2-mutaties (fig. 4).²³ Het lijkt dus mogelijk om door mid-

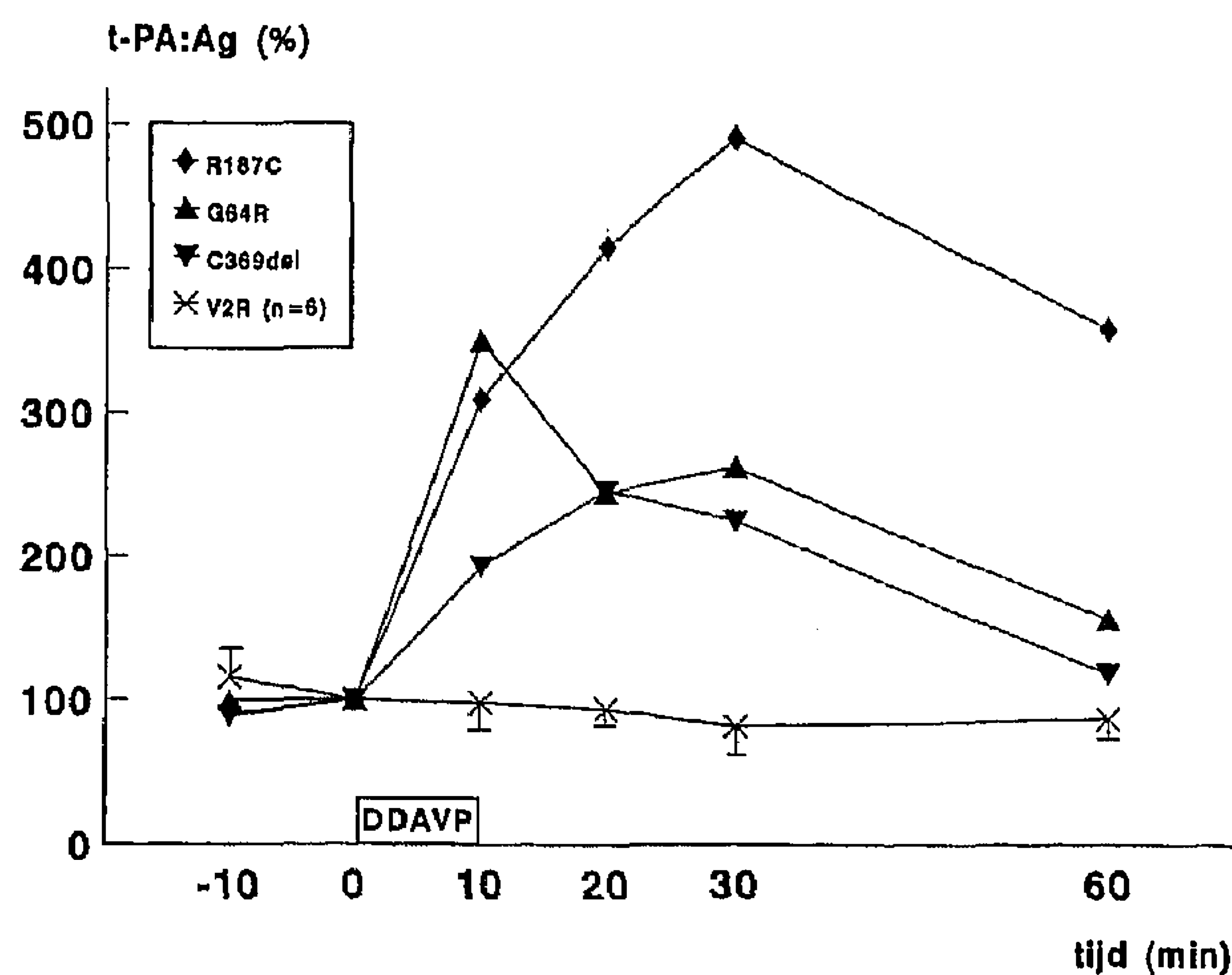


Fig. 4. Weefseltype plasminogeen-activator-antigeen (tPA:Ag)-reactie op DDAVP-administratie bij 3 NDI-patiënten met een aquaporine 2-defect. De gemiddelde waarde en standaardfout van het gemiddelde van 6 patiënten met een V_2 -receptormutatie worden eveneens weergegeven. De tPA:Ag-waarden zijn uitgedrukt als percentage van de waarden op $t = 0$ (100%).

del van een DDAVP-test patiënten met aquaporine 2-NDI te onderscheiden van patiënten met V_2 -receptor-NDI. Behoudens dit verschil zijn er vooralsnog geen duidelijke fenotypische verschillen tussen beide groepen gevonden.

VASOPRESSINE-ONGEVOELIGHEID BIJ VROUWEN

In de literatuur is een aantal vrouwen beschreven met een klinisch manifeste NDI (overzicht in Van Lieburg et al.²⁴). Na de ontdekking van aquaporine 2-mutaties als oorzaak van de autosomaal recessieve vorm van NDI leek het zeer waarschijnlijk dat deze vrouwen een aquaporine 2-defect zouden vertonen. Recent werden vier families beschreven waarin vrouwen met een manifeste NDI heterozygoot bleken te zijn voor een mutatie in het V_2 -receptorgen.^{24,25} Bij vier vrouwelijke patiënten bleef de maximale urineosmolaliteit na DDAVP beneden 200 mosmol/l. Daarnaast waren bij twee van hen de extrarenale reacties na DDAVP afwezig, terwijl één patiënte een normale stijging van factor VIII vertoonde.^{24,25} In drie van de vier families bleek ook bij asymptomatische vrouwelijke familieleden heterozygotie voor dezelfde V_2 -receptormutatie aanwezig te zijn. De beste verklaring voor het voorkomen van verschillende fenotypen, variërend van geen symptomen tot volledige manifestatie van de ziekte, bij draagsters van een mutatie in het V_2 -receptorgen is een scheve verdeling van het X-inactivatiepatroon. In dat geval zou bij symptomatische vrouwen in meer dan 50% van de cellen inactivatie van het normale allel optreden, een fenomeen dat ook is waargenomen bij andere geslachtsgebonden aandoeningen zoals hemofilie en de ziekte van Duchenne. De discrepantie tussen renale en extrarenale reacties op DDAVP bij een van de bovengenoemde patiënten wijst op variatie in het X-inactivatiepatroon tussen verschillende weefsels.

DISCUSSIE

Tot op heden zijn twee genetische defecten geïdentificeerd die verantwoordelijk zijn voor het NDI-fenotype. De defecte genen coderen voor eiwitten die het begin en einde van de cellulaire vasopressinesignaalketen vormen. De detectie en analyse van natuurlijke mutaties in deze genen hebben het inzicht in de biologische functie en de relatie tussen structuur en functie van zowel de V_2 -receptor als het aquaporine 2-waterkanaal verruimd. In de toekomst zal dit inzicht met de identificatie en *in vitro*-expressie van nieuwe mutaties verder toenemen. Er is een aantal patiënten bekend dat noch een mutatie heeft in het coderende gedeelte van het V_2 -receptorgen, noch in het coderende

deel van het aquaporine 2-gen. Of deze patiënten mutaties hebben in de niet-coderende gedeelten van deze genen, dan wel een derde categorie patiënten vertegenwoordigen met een defect in een ander eiwit van de cellulaire vasopressinesignaalketen, is onbekend. Uiteraard zou de identificatie van zo'n derde categorie NDI-patiënten de kennis van de processen die in de cel plaatsvinden na AVP-stimulatie verder vergroten. De ontdekking van twee genetisch verschillende defecten heeft ook consequenties voor de genetische counseling, met name wanneer het sporadische patiënten betreft. In die gevallen kan een DDAVP-test, althans bij mannelijke patiënten, een eerste indicatie geven of het defect in de receptor dan wel in het waterkanaal gelegen moet zijn. Vervolgens kan door gericht DNA-onderzoek de oorzakelijke mutatie worden vastgesteld. Bij vrouwen met een klinisch manifeste NDI bij wie de stamboom geen zekerheid geeft over het overervingspatroon, kan alleen DNA-onderzoek uitsluitend geven over de genetische oorzaak.

Wij danken M.A.J. Verdijk voor haar technische assistentie. Het Nijmeegse NDI-onderzoek wordt gesubsidieerd door de Nierstichting Nederland.

Academisch Ziekenhuis Nijmegen, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen. Afd. Anthropogenetica: Dr. N.V.A.M. Knoers, klinisch geneticus; Prof. dr. B.A. van Oost, moleculair bioloog (thans Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit van Utrecht). Afd. kindergeneeskunde: Drs. A.F. van Lieburg, arts-onderzoekster; Prof. dr. L.A.H. Monnens, kinderarts. Afd. Celfysiologie: Prof. Dr. C.H. van Os, celfysioloog; Dr. P.M.T. Deen, moleculair bioloog. Correspondent: Mevr. dr. N.V.A.M. Knoers.

LITERATUUR

- 1 Knoers N, Monnens LAH. Nephrogenic diabetes insipidus: clinical symptoms, pathogenesis and treatment. *Pediatr Nephrol* 1992;6:476-82.
- 2 Hoekstra JA, Lieburg AF van, Monnens LAH, et al. Cognitive and psychosocial functioning of patients with congenital nephrogenic diabetes insipidus. *Am J Med Genet* 1996;61:81-8.
- 3 Rosenthal W, Seibold A, Antamarian A, et al. Molecular identification of the gene responsible for congenital nephrogenic diabetes insipidus. *Nature* 1992;359:233-5.
- 4 Pan Y, Metzberg, Das S, Jing B, Gitschier J. Mutations in the vasopressin V₂ receptor are associated with X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *Nature Genet* 1992;2:103-6.
- 5 Ouweland AMW van den, Dreesen JCFM, Verdijk M, et al. Mutations in the vasopressin type 2 receptor gene (AVPR2) associated with nephrogenic diabetes insipidus. *Nature Genet* 1992;2:99-102.
- 6 Deen PMT, Verdijk MAJ, Knoers NVAM, et al. Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine. *Science* 1994;264:92-5.
- 7 Birnbaumer M, Seibold A, Gilbert S, et al. Molecular cloning of the receptor for human antidiuretic hormone. *Nature* 1992;357:333-5.
- 8 Fushimi K, Uchida S, Harra Y, et al. Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature* 1993;361:549-52.
- 9 Ma T, Kasegawa H, Shack WR, et al. Expression, functional analysis, and in-situ hybridization of a cloned rat kidney collecting duct water channel. *Am J Physiol* 1994;266:C189-97.
- 10 DiGiovanni SR, Nielsen S, Christensen EI, Knepper MA. Regulation of collecting duct water channel expression by vasopressin in Brattleboro rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:8984-8.
- 11 Bichet DG, Razi M, Lonergan M, et al. Hemodynamic and coagulation responses to 1-desamino [8-D-arginine] vasopressin in patients with congenital nephrogenic diabetes insipidus. *N Engl J Med* 1988;318:881-7.
- 12 Knoers N, Heyden H van der, Oost BA van, et al. Nephrogenic diabetes insipidus: close linkage with markers from the distal long arm of the human X-chromosome. *Hum Genet* 1988;80:31-8.
- 13 Ouweland A van den, Knoop MT, Knoers VVAM, et al. Colocalization of the gene for nephrogenic diabetes insipidus (DI_R) and the vasopressin type-2 receptor (AVPR2) in the Xq28 region. *Genomics* 1992;13:1350-3.
- 14 Knoers NVAM. Molecular characterization of nephrogenic diabetes insipidus. *Trends Endocrinol Metab* 1994;5:422-8.
- 15 Fujiwara TM, Morgan K, Bichet DG. Molecular biology of diabetes insipidus. *Annu Rev Med* 1995;46:331-43.
- 16 Pan Y, Wilson P, Gitschier J. The effect of eight V₂ receptor mutations on stimulation of adenylyl cyclase and binding to vasopressin. *J Biol Chem* 1994;269:31933-7.
- 17 Lieburg AF van, Verdijk MAJ, Knoers VVAM, et al. In vitro expression of mutations in the V₂ receptor gene—confirmation of their role in the pathogenesis of X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *Pediatr Nephrol* 1994;8:C75.
- 18 Birnbaumer M, Gilbert S, Rosenthal W. An extracellular congenital nephrogenic diabetes insipidus mutation in the vasopressin receptor reduces cell surface expression, affinity for ligand, and coupling to the Gs-adenylyl cyclase system. *Mol Endocrinol* 1994;8:886-94.
- 19 Rosenthal W, Antamarian A, Gilbert S, Birnbaumer M. Nephrogenic diabetes insipidus. A V₂ vasopressin receptor unable to stimulate adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 1993;268:13030-3.
- 20 Knoers N, Monnens LAH. A variant of nephrogenic diabetes insipidus: V₂ receptor abnormality restricted to the kidney. *Eur J Pediatr* 1991;150:370-3.
- 21 Lieburg AF van, Verdijk MAJ, Knoers VVAM, et al. Patients with autosomal nephrogenic diabetes insipidus homozygous for mutations in the aquaporin-2 water channel gene. *Am J Hum Genet* 1994;55:648-52.
- 22 Deen PMT, Croes H, Aubel RAMH van, et al. Water channels encoded by mutant aquaporin-2 genes in nephrogenic diabetes insipidus are impaired in their cellular routing. *J Clin Invest* 1995;95:2291-6.
- 23 Lieburg AF van, Knoers VVAM, Mallman R, et al. Normal fibrinolytic responses to 1-desamino-8-D-arginine vasopressin in patients with nephrogenic diabetes insipidus caused by mutations in the aquaporin-2 gene. *Nephron* 1996;72:544-6.
- 24 Lieburg AF van, Verdijk MAJ, Schoute F, et al. Clinical phenotype of nephrogenic diabetes insipidus in females heterozygous for a vasopressin type-2 receptor mutation. *Hum Genet* 1995;96:70-8.
- 25 Moses AM, Sangain G, Miller JL. Proposed cause of marked vasopressin resistance in a female with an X-linked recessive V₂ receptor abnormality. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:1184-6.

Aanvaard 28 maart 1996.