

Membranproteine

Aquaporin-Wasserkanäle (Nobel-Vortrag)**

Peter Agre*

Vielen Dank. Ich bin sprachlos, ich fühle mich geehrt. Es ist der Traum eines jeden Wissenschaftlers, den Nobel-Vortrag in Stockholm zu halten. Aber ich wäre nicht aufrichtig, wenn ich Ihnen nicht sagen würde, dass es mich ein wenig nervös macht, hier auf diesem Podium zu stehen. Ich habe einige Male in Schweden vorgetragen, und ich möchte Ihnen von einigen Ereignissen im Vorfeld einer Vorlesung erzählen, die ich vor einigen Jahren hier gehalten habe. Seinerzeit stand ich nach meiner Ankunft auf dem Flughafen von Arlanda in der Schlange vor der Passkontrolle unmittelbar hinter einer Gruppe von Geschäftsleuten, wie unschwer an ihren Aktentaschen zu erkennen war. Ich hörte, wie der erste in der Reihe vom Zollbeamten nach dem Grund seines Aufenthalts in Schweden gefragt wurde. Als der Mann „Geschäfte“ angab, zeigte sich der Beamte zufrieden und stempelte seinen Pass. Nacheinander trat jeder einzeln vor, jedem wurde die gleiche Frage gestellt, jeder antwortete „Geschäfte“, und einer nach dem anderen durfte anstandslos passieren. Schließlich war ich an der Reihe – mit zerknitterter Kleidung, nach einer Nacht in der Economy-Klasse einer SAS-Maschine. Der Beamte fragte mich nach dem Grund meines Aufenthalts, und ich sagte ihm, ich sei hier, um die Von-Euler-Vorlesung am Karolinska-Institut zu halten. Er blickte auf, starnte mich an und fragte: „Sind Sie nervös?“ In diesem Moment wurde ich wirklich äußerst nervös, und ich sagte: „Ja, ich bin ein klein wenig nervös.“ Der Beamte blickte wieder auf: „Nun, das sollten sie auch sein!“ Wenn der Vortragende Ihnen also ein klein wenig nervös vorkommt, dann liegt das an Arlanda.

Einleitung

Ich werde über Aquaporin-Wasserkanäle vortragen. Wir untersuchen diese Proteine schon seit einigen Jahren, und sie erklären uns, wie Wasser durch biologische Membranen gelangt. Wasser gilt gemeinhin als das „Lösungsmittel des Lebens“, weil unser Körper zu 70 % aus Wasser besteht. Auch in allen anderen Wirbeltieren, Weichtieren, Mikroben und Pflanzen ist Wasser der Hauptbestandteil. Die Verteilung von Wasser in biologischen Kompartimenten ist von grundlegender Bedeutung für Lebensprozesse. Die Aquaporine bilden das „Wasserleitungssystem“ der Zellen: Sie erklären, wie unser Gehirn die Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit sekretiert und absorbiert, wie die Augenflüssigkeit erzeugt wird, wie wir Tränen, Speichel, Schweiß und Gallenflüssigkeit ausscheiden und warum unsere Nieren so wirksam Urin aufkonzentrieren können. Diese Proteine spielen in der Physiologie von Säugern, aber auch bei Mikroorganismen und Pflanzen eine fundamentale Rolle.

Stichwörter:

Aquaporine · Medizinische Chemie · Membranproteine · Nobel-Vortrag · Proteinstrukturen

Aus dem Inhalt

| | |
|--|------|
| Einleitung | 4377 |
| Die Entdeckung von AQP1 | 4378 |
| Die Struktur von AQP1 | 4380 |
| Die Proteinfamilie der Aquaporine und Aquaglyceroporine | 4381 |
| AQP1-Proteine in Nieren | 4381 |
| AQP1-null-Phänotyp | 4383 |
| Andere Aquaporine – AQP2 im Sammelrohr | 4384 |
| AQP6 in Säure sekretierenden Zellen | 4385 |
| AQPo in Augenlinsen | 4385 |
| AQP4 im Gehirn | 4386 |
| AQP5 in Drüsen | 4386 |
| Die Aquaglyceroporine AQP7 und AQP9 | 4387 |
| Nichthumane Aquaporine | 4387 |
| Zusammenfassung | 4387 |

[*] Prof. Dr. P. Agre
The Johns Hopkins University
School of Medicine
Baltimore, MD 21205 (USA)
Fax: (+1) 410-955-3149
E-mail: pagre@jhmi.edu

[**] Copyright© The Nobel Foundation 2003. Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck einer deutschen Fassung des Vortrags.

Ich möchte zu Beginn die Wissenschaftler würdigen, die sich lange vor uns mit diesem Thema beschäftigt haben. Nachdem man bereits in den 20er Jahren erkannt hatte, dass eine Lipiddoppelschicht die Plasmamembran von Zellen bildet, wurde völlig richtig postuliert, dass Wasser die Membran durch Diffusion durch die Lipiddoppelschicht leicht passieren könnte. Heute wissen wir, dass die Lipiddoppelschicht selbst nur eine begrenzte Permeabilität für Wasser hat. Am Transport von Wasser durch Membranen hat eine Gruppe von Proteinen großen Anteil: die Aquaporine. Ihre Existenz war schon Jahrzehnte bevor wir begannen, uns mit dem Thema zu beschäftigen, vorgeschlagen worden. Maßgeblich beteiligt an diesen Forschungen waren unter anderem Arthur K. Solomon in Boston, Alan Finkelstein in New York, Robert Macey in Berkeley, Gheorghe Benga in Rumänien, Guillermo Whittembury in Venezuela und Mario Parisi in Argentinien. Sie stellten seinerzeit mit biophysikalischen Methoden fest, dass in bestimmten Zelltypen wie Nierentubuli, Speicheldrüsen und roten Blutzellen, die hoch permeabel für Wasser sind, Wasserkäne vorkommen müssen (siehe hierzu die Übersicht von Finkelstein^[1]).

Der Unterschied zwischen diffusiver und kanalvermittelter Permeabilität für Wasser ist leicht ersichtlich: Der Diffusionsprozess ist bidirektional, läuft mit niedriger Permeation ab und tritt bei allen Zellmembranen auf. Hingegen sind Zellmembranen, die Aquaporin-Proteine enthalten, hoch permeabel für Wasser. Die Permeabilität ist selektiv, weil Wasser (H_2O) fast widerstandslos die Membranen durchquert, während Hydronium-Ionen (H_3O^+) nicht in die Proteine eindringen – und diese Unterscheidung ist lebenswichtig. Wie ich später noch erläutern werde, reabsorbieren unsere Nieren 99% des Wassers aus dem Primärfiltrat (Primärharn) und bewahren uns damit vor dem Austrocknen. Würden unsere Nieren Wasser *und* Säure reabsorbieren, so wäre eine systemische Acidose die Folge.

Der Wasserfluss wird durch osmotische Gradienten gesteuert; die Aquaporine sind somit keine Pumpen oder Austauscher, sondern sie bilden eine Pore, die es dem Wasser ermöglicht, die Membran schnell zu durchqueren. Die treibende Kraft dabei ist ein Phänomen, das wir alle noch aus dem Schulunterricht kennen: die Osmose. Es gibt noch weitere Unterschiede zwischen diffusivem und kanalvermitteltem Wassertransport. Inhibitoren von einfachen Diffusionsprozessen sind nicht bekannt, dagegen wurden Quecksilberverbindungen entdeckt (durch Robert Macey), die den



Peter Agre erhielt seinen MD 1974 von der Johns Hopkins University (Baltimore, Maryland, USA). Postdoc-Aufenthalte führten ihn an die Case Western Reserve University (1975–1978) und an die University of North Carolina at Chapel Hill (1980–1981). Nach Forschungsarbeiten in der Gruppe von V. Bennett (1981–1983) wurde er 1984 Assistant Professor an der Johns Hopkins School of Medicine. Dort ist er seit 1993 Professor of Biological Chemistry und Professor of Medicine. Für seine Arbeiten zu Aquaporinen wurde er 2003 mit dem Nobel-Preis für Chemie ausgezeichnet.

Wassertransport in roten Blutzellen inhibieren; die Permeabilität wird aber durch Reduktionsmittel wiederhergestellt.^[2] Diese Beobachtungen legten nahe, dass Wasserkäne Proteine mit Sulfanylgruppen und charakteristisch niedrigen Arrhenius-Aktivierungsenergien sind.

Eine Reihe von ausgeklügelten Ansätzen wurde entwickelt, um die Moleküle zu identifizieren, aus denen die Wasserkäne aufgebaut sind. Diese Analysen gestalteten sich äußerst schwierig, denn Wasser kommt praktisch im gesamten Organismus vor; es kann auch nicht mit photoaktiven Seitenketten modifiziert werden. Versuche von Expressionsklonierungen waren nicht erfolgreich. In einigen Fällen wurden Membranproteine mit isotopen Quecksilberverbindungen markiert, so der Anionenaustauscher (Band-3-Protein) durch Solomon und die Band-4.5-Proteine durch Benga. Allerdings konnte keines dieser Proteine isoliert und rekonstituiert werden, und es wurde auch kein Wassertransport nachgewiesen (siehe Übersicht in Lit. [3]).

Die Entdeckung von AQP1

Die Forschungen hatten einen toten Punkt erreicht, als wir – mit einer gehörigen Portion Glück – das Protein entdeckten, das die Frage nach der Existenz von Wasserkänen beantworten sollte. Als ich kürzlich in den Notizheften blätterte, in denen wir damals die ersten Studien vermerkten, die auf die Existenz eines solchen Proteins hinwiesen, stieß ich auf eine Autoradiogramm, das mein erster Laborassistent Andy Asimos angefertigt hatte. Ich war seinerzeit Hämatologe, und wir untersuchten die Rhesus(Rh)-Blutgruppenantigene. Wir versuchten, in Kaninchen Antikörper für das denaturierte teilgereinigte Rh-Polypeptid zu züchten. Die Kaninchen produzierten kräftig Antikörper, die mit einem Polypeptid von ungefähr 30 kDa und mehreren höheren Oligomeren und glycosylierten Proteinen reagierten. Vor lauter Freude über diese Ergebnisse war uns aber zunächst entgangen, dass unser Antikörper gar nicht mit dem Rh-Kernpolypeptid (bei 32 kDa) reagierte, das wir durch Natriumdeodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) eindeutig nachweisen konnten, sondern mit einem Polypeptid von 28 kDa, das wir fälschlicherweise für ein Abbauprodukt des größeren Rh-Polypeptids hielten. Tatsächlich handelte es sich bei dem kleineren Protein aber um eine Verunreinigung in unseren Rh-Präparaten.

Das 28-kDa-Protein zeigte einige hoch interessante Merkmale. Brad Denker, einem Postdoc, und der Laborassistentin Barbara Smith gelang es, das Protein durch eine einfache Methode basierend auf Tensidlöslichkeiten zu isolieren. Durch Anfärbung des Elektrophoresegels mit Silberionen konnten sie eine diskrete Bande bei 28 kDa im tensid-unlöslichen Extrakt nachweisen. Niemand hatte dieses Protein zuvor beobachtet, da es von herkömmlichen Anfärbemitteln wie Coomassie-Blau nicht detektiert wird. Das reine Protein wurde anschließend in größerem Maßstab aus Membranen von humanen roten Blutzellen isoliert.^[4,5]

Besonders beeindruckend waren die Mengen, in denen das 28-kDa-Protein gefunden wurde: Mit etwa 200 000 Exemplaren pro roter Blutzelle war es eines der Hauptproteine

der Membran. Das ist ungefähr so, als würde man eine Straße im Norden Schwedens entlangfahren und auf eine Stadt mit 200000 Einwohnern treffen, die auf keiner Landkarte verzeichnet ist! Darüber hinaus deutete einiges darauf hin, dass es sich bei dem Protein um ein tetrameres Transmembranprotein handelt, das als Kanal fungieren sollte – ein Kanal, aber wofür? Das aufgereinigte Protein lieferte uns auch die N-terminale Aminosäuresequenz, die wir für die Klonierung der cDNA verwendeten. Mit unserem Antikörper untersuchten wir einige weitere Gewebetypen und fanden, dass das Protein auch in menschlichen Nieren beeindruckend häufig vorkommt. Wir beobachteten eine Anfärbung auf den apikalnen und basolateralen Membranen proximaler Nierentubuli und auf dem dünnen Teil des absteigenden Schenkels der Henleschen Schleife, aber wir konnten uns die Funktion des Proteins immer noch nicht erklären.

Als Naturwissenschaftler ist man stets gut beraten, alle zur Verfügung stehenden Ressourcen zu nutzen, wenn es ein schwieriges Problem zu lösen gilt. Eine der wichtigsten Ressourcen ist das Wissen von Kollegen. Ich diskutierte das Protein also mit einem Dutzend oder mehr Biochemikern und Physiologen, aber keiner konnte seine Funktion erklären. Mein damaliger Mentor John C. Parker (1935–1993) an der University of North Carolina at Chapel Hill wies als erster darauf hin, dass sowohl rote Blutzellen als auch Nierentubuli eine außergewöhnlich hohe Permeabilität für Wasser haben. Er schlug daher eine mögliche Funktion beim Wassertransport durch Membranen vor. Leider konnte er unsere späteren Studien nicht mehr verfolgen, aber er war Zeuge unserer ersten Entdeckung.

Gregory Preston, damals Postdoc in meiner Arbeitsgruppe, klonierte die cDNA aus einer Erythroid-Bibliothek.^[6] Die kodierende Region entsprach einem 269 Aminosäuren großen Polypeptid, für das eine Hydropathieanalyse sechs Transmembrandomänen voraussagte. Interessanterweise waren die aminotermrale (Repeat 1) und die carboxytermrale Hälfte (Repeat 2) des Moleküls bei 20% Identität genetisch verwandt. Die Schleifen B und E waren sich noch ähnlicher: Beide enthielten die gleiche Signatursequenz Asparaginsäure-Prolin-Alanin (NPA, Abbildung 1). Beim Abgleich mit der Gendatenbank stießen wir auf mehrere sequenzverwandte DNAs diversen Ursprungs, darunter solche aus der Augenlinse der Kuh, aus dem Gehirn der Fruchtfliege, aus Bakterien und Pflanzen. Eine Funktion war aber für keine der Sequenzen bekannt.

Diese Anhaltspunkte bestärkten uns in der Annahme, dass das 28-kDa-Protein ein Wassertransporter war. Entsprechend begannen wir, in Zusammenarbeit mit unserem Kollegen Bill Guggino an der Johns Hopkins University, das Protein auf eine mögliche Wassertransportfunktion zu untersuchen. Wir verwendeten dabei Oozyten aus dem Frosch *Xenopus laevis*. Diese Frosch-Oozyten sind ein sehr praktisches Expressionssystem, da ihre Permeabilität für Wasser sehr niedrig ist (um in Süßwasserteichen zu überleben). In die Test-Oozyten wurden 2 ng der für unser Protein kodierenden cRNA injiziert, in Kontroll-Oozyten injizierten wir reines Wasser. Nach dreitägiger Proteinsynthese erschienen beide Oozytenproben im Wesentlichen identisch. Nun überführten wir die Oozyten in destilliertes Wasser, und augenblicklich

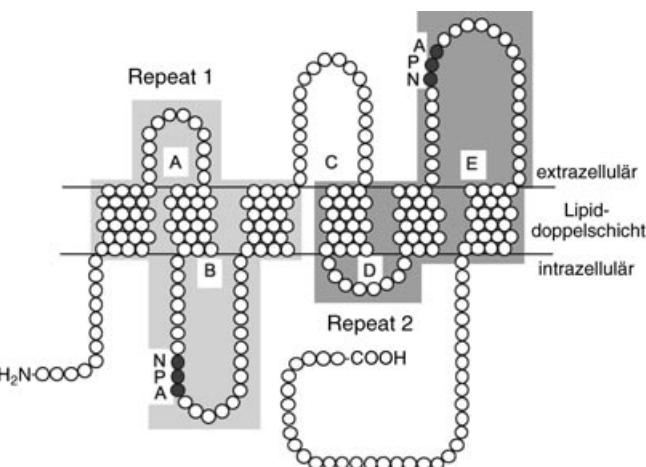


Abbildung 1. Aus der Aminosäurensitzung abgeleiteter Aufbau von AQP1 in der Membran. Die beiden Tandem-Repeat-Einheiten des Proteins haben jeweils drei Transmembrandomänen und sind um 180° gegeneinander verdreht. Die Schleifen B und E enthalten das konser- vierte Motiv Asn-Pro-Ala (NPA).

zeigte sich ein erstaunlicher Unterschied: Die Kontroll-Oozyten blieben infolge ihrer sehr niedrigen Permeabilität für Wasser unverändert, die Test-Oozyten platzen dagegen wie Popcorn (Abbildung 2).^[7] Dieses Ergebnis löste in unserer Arbeitsgruppe eine Begeisterung aus, die heute noch zu spüren ist. Das Protein wurde „Aquaporin“ getauft und firmiert jetzt unter der offiziellen Bezeichnung „AQP1“ als das erste funktional definierte Wasserkanalprotein.^[8]

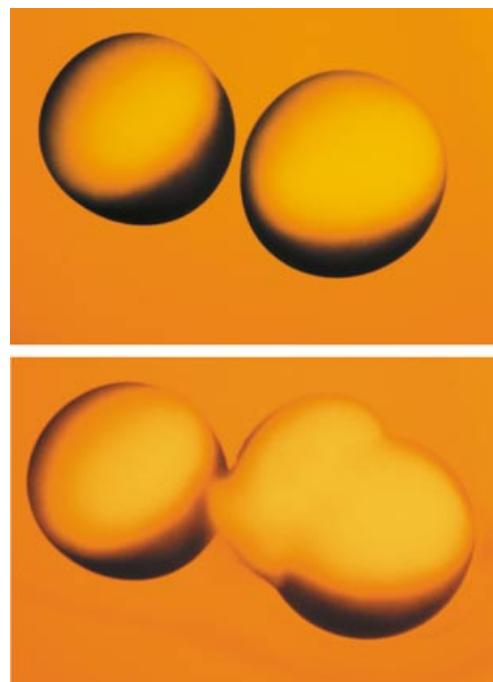


Abbildung 2. Die Funktion von AQP1-Wasserkanälen in Oozyten von *Xenopus laevis*. Die Kontroll-Oozyte (links) erhielt eine Injektion von reinem Wasser, die Test-Oozyte (rechts) eine Injektion der für AQP1 codierenden cRNA. Nach Überführen der Oozyten in eine hypotonische Pufferlösung begann die Test-Oozyte bereits nach 30 Sekunden anzuschwellen (oben) und war nach 3 Minuten geplatzt (unten). Wiedergabe in veränderter Form mit Genehmigung aus Lit. [7].

Wir konnten die Funktion des Proteins durch Studien an aufgereinigtem, in synthetischen Lipidvesikeln von ca. 0.1 µm Durchmesser rekonstituiertem AQP1 bestätigen.^[9] Die Präparate waren von unserer Kollegin Suresh Ambudkar an der Johns Hopkins University angefertigt worden. Diese einfachen Membranvesikel wurden von unserem Kollegen Arvid Maunsbach an der Universität Aarhus durch Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie untersucht. Lipid, das ohne das Protein rekonstituiert wurde, hatte eine weiche Membranoberfläche, wohingegen Membranen, die mit AQP1 rekonstituiert wurden, viele Intramembranpartikel mit 0.01 µm Durchmesser enthielten.^[10] In Zusammenarbeit mit Mark Zeidel an der Harvard Medical School untersuchten wir die Membranen auf Permeabilität für Wasser. Beim Stopped-Flow-Transfer in hypertonische Pufferlösungen schrumpften die einfachen Liposomen binnen einer halben Sekunde auf eine konstante Größe; wir nehmen an, dass dies die Grundpermeabilität für Wasser widerspiegelt. Die mit AQP1 rekonstituierten Membranen schrumpften weitaus schneller und erreichten ihre Gleichgewichtsgröße schon nach 20 ms. Dass die Wassermoleküle kanalvermittelt durch die Membran gelangen, wurde dadurch belegt, dass Quecksilerverbindungen den Transport inhibieren. Wir berechneten die Arrhenius-Aktivierungsenergie (< 5 kcal mol⁻¹) und bestimmten eine Permeabilität von ca. 3×10^9 Wassermolekülen pro Untereinheit und Sekunde. Wir versuchten auch, die Permeabilität von AQP1 für Protonen zu messen, aber trotz der hohen Permeabilität für Wasser beobachteten wir keine Säurepermeation. Diese Studien belegten, dass wir tatsächlich das lange gesuchte Wasserkanalprotein isoliert hatten.

Die Struktur von AQP1

Nach der Identifizierung des Proteins wurden intensiv nach den Bindungsstellen für die Quecksilberinhibitoren gesucht, deren Existenz anhand der Studien von Macey postuliert wurde. Quecksilerverbindungen reagieren mit der Sulfanylgruppe von Cystein. Das AQP1-Polypeptid enthält vier Cystein-Reste, aber nur der Rest in der E-Schleife (Cys-189, in der Nähe des zweiten NPA-Motivs) wird durch Quecksilerverbindungen komplexiert. Wir veränderten die AQP1-Sequenz durch zielgerichtete Mutagenese und exprimierten das rekombinante Protein in Oozyten. Die Mutation dieses Rests zu Serin (Cys-189-Ser) führte zu einer vollständigen Permeabilität für Wasser, eine Inhibition durch Quecksilerverbindungen war nicht mehr festzustellen. Nach Austausch von Alanin in der entsprechenden Position in Schleife B gegen Cystein (Ala-73-Cys) wurde eine durch Quecksilerverbindungen inhibierbare Permeabilität für Wasser beobachtet.^[11] Substitutionen in anderen Positionen von AQP1 blieben ohne Auswirkung. Aus diesen Befunden schlossen wir, dass die Schleifen B und E in gegenüberliegenden Molekühlhälfte auf irgendeine Weise die Wasserpore bilden mussten. Dieses Modell, das sich als korrekt erwies, erhielt von uns den Namen „das Stundenglas“ in Anlehnung an den altägyptischen Zeitmesser, bei dem Sand von der oberen in die untere Kammer rieselt; wird diese Uhr umgedreht, so rieselt der Sand in die entgegengesetzte Richtung.

Wir fanden, dass sechs Transmembrandomänen eine zentrale Domäne umgeben, die von den Schleifen B und E aufgebaut wird; Schleife B kommt dabei von der cytoplasmatischen Seite, Schleife E von der extrazellulären Seite (Abbildung 3). Durch Überlappung der Schleifen B und E entsteht eine einzelne Wasserpore im Zentrum des Moleküls. Die NPA-Motive sind gegenüberliegend angeordnet, und die Bindungsstellen für Quecksilberinhibitoren befinden sich längs der Pore.^[12] Das AQP1-Protein ist ein Tetramer mit einer zentralen Pore in jeder Untereinheit. Strukturell unterscheidet es sich damit grundlegend von den Ionenkanälen, bei denen, wie Rod MacKinnon in seinem Vortrag erläutert, vier Untereinheiten eine einzige zentrale Pore umgeben.

Zusammen mit Andreas Engel und Mitarbeitern am Biozentrum Basel versuchten wir nun, eine hochauflöste Struktur von AQP1 zu erhalten. An diesen Studien beteiligten sich später auch Yoshinori Fujiyoshi und Mitarbeiter an der Universität Kyoto. AQP1 aus humanen roten Blutzellen wurde von Barb Smith in unserem Laboratorium aufgereinigt; einer von Andreas' Studenten, Tom Walz, rekonstituierte das Protein in sehr hohen Konzentrationen in synthetischen Membranen. Unter diesen Bedingungen bildet AQP1 bemerkenswert symmetrische Anordnungen, die als Membrankristalle bezeichnet werden. Durch Messung der Permeabilität für Wasser konnten wir bestätigen, dass die Proteinfunktion vollständig erhalten geblieben war, und wir waren zuversichtlich, dass unser Strukturvorschlag mit der biologisch relevanten Struktur übereinstimmte.^[13]

Mithilfe von Kryoelektronenmikroskopie und Kraftfeldmikroskopie gelang es unseren Kollegen in Basel und Kyoto, eine Elektronendichthecke von humanem AQP1 mit 3.8 Å Auflösung anzufertigen. Die Ergebnisse aus unseren Studien zur zielgerichteten Mutagenese dienten als Randbedingungen bei der Entwicklung von Strukturmodellen des Proteins.^[14] Betrachtet man einen Querschnitt durch eine AQP1-Untereinheit in der Mitte der Membran doppelschicht, so sieht man eine einzelne Wasserpore, die weitgehend mit hydrophoben Resten ausgekleidet ist; die beiden hoch konservierten Asparaginsäurereste der NPA-Motive befinden sich gegenüber diesem hydrophoben Bereich. Ein Längsschnitt zeigt die enge Wasserpore mit diesen beiden Asparaginsäureresten.

Wir fragten uns, wie eine einfache Pore ohne bewegliche Komponenten einen schnellen Wassertransport bewirken kann, ohne zugleich Protonen zu transportieren. In eleganten Studien von den Arbeitsgruppen um Robert Stroud an der UCSF und Bing Jap am Lawrence Berkeley Laboratory wurden die Röntgenkristallstrukturen des Glycerin-Kanals GlpF aus *E. coli*^[15] und von AQP1 aus bovinen roten Blutzellen^[16] mit 2.2 Å Auflösung gelöst. Diese Resultate wiederum ermöglichten Moleküldynamiksimulationen durch Bert de Groot und Helmut Grubmüller an der Universität Göttingen^[17] und durch Klaus Schulten und Mitarbeiter an der University of Illinois at Urbana-Champaign.^[18] Dank dieser Studien verstehen wir jetzt, wie es dem Protein gelingt, Wasser, aber keine Protonen zu transportieren. Wäre Wasser einfach H₂O, so wäre es ein Gas (wie im Dampf). Wasser liegt aber als (H₂O)_n vor: Wasserstoffbrücken zwischen benachbarten Wassermolekülen bewirken, dass Wasser flüssig ist. Läge Wasser als Stapel von Wassermolekülen vor, dann

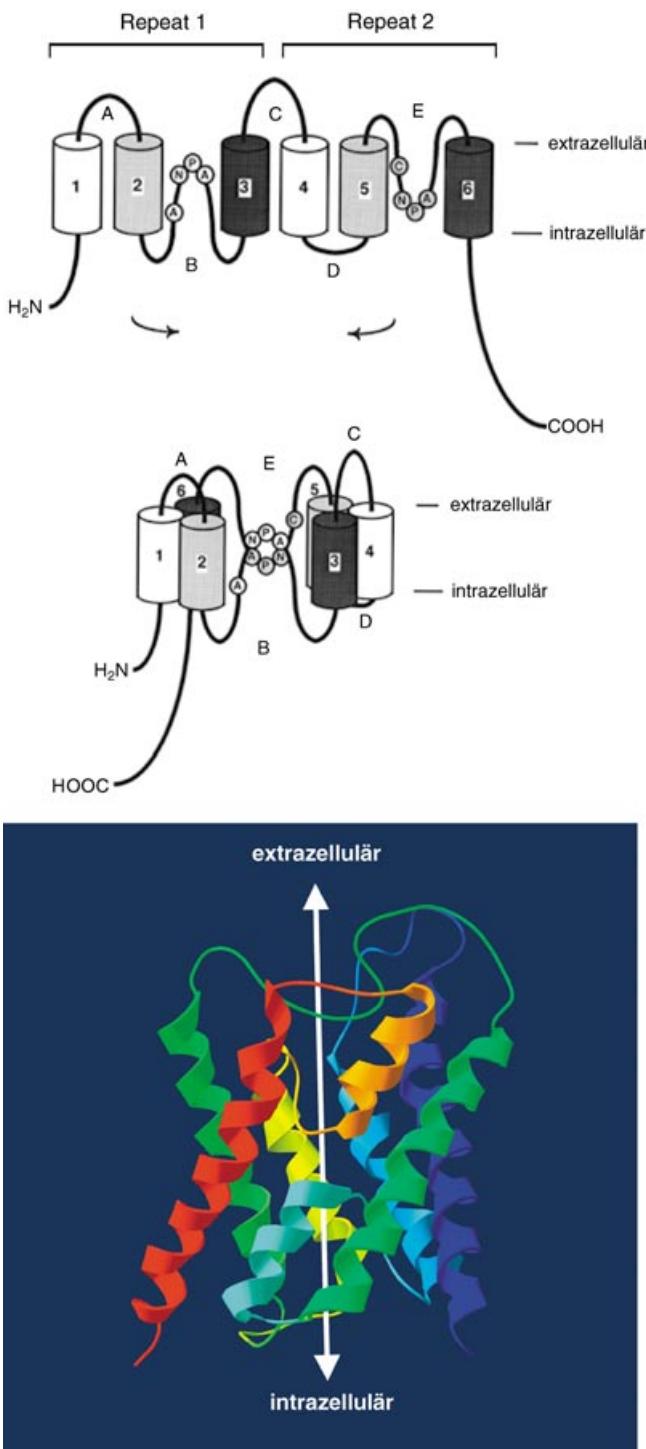


Abbildung 3. Stundenglas-Modell für die Membrantopologie der AQP1-Untereinheit. Oben: schematische Darstellung der Faltung der Schleifen B und E; die Schleifen überlappen in der Lipiddoppelschicht und bilden einen einzelnen Wasserkanal. Unten: Bändermodell der dreidimensionalen Struktur der AQP1-Untereinheit. Wiedergabe in veränderter Form mit Genehmigung aus Lit. [12] und [19].

würden Protonen gemäß dem Grotthuß-Mechanismus von einem Wassermolekül zum anderen weitergereicht („proton wire“).

Die Stundenglas-Struktur des AQP1-Moleküls besteht aus einer extrazellulären Kammer und einer internen

Kammer, die Wasser in flüssiger Form enthalten. Zwischen diesen Kammern befindet sich ein ca. 20 Å langes enges Verbindungsstück, durch das die Wassermoleküle einzeln hindurchgelangen können, während Protonen zurückgestreut werden. Nahe der Oberseite dieses Verbindungsstücks ist der Kanal mit 2.8 Å Durchmesser am schmalsten. Somit ist die Pore gerade groß genug, um ein einzelnes Wassermolekül aufzunehmen. An dieser Bindungsstelle ist die positiv geladene Seitenkette eines vollständig konservierten Argininrests fixiert, die in der E-Schleife auf das NPA-Motiv folgt. An der anderen Wand befindet sich ein Histidinrest mit ebenfalls positiver Ladung. Diese beiden positiv geladenen Gruppen stoßen ankommende Protonen ab. Eine weitere Barriere für Protonen entsteht dadurch, dass ein Wassermolekül simultan Wasserstoffbrücken zu den Seitenketten der Asparaginsäurereste der gegenüberliegenden NPA-Motive bildet, wodurch der Dipol des Wassermoleküls umorientiert wird. Ferner werden auch durch die nicht-transmembranen α-Helices an den distalen Enden der Schleifen B und E positive Partialladungen beigesteuert, die ebenfalls zur Blockierung der Protonenleitung beitragen (Abbildung 4, links; siehe hierzu die Übersicht von Kozono et al.^[19]). Aus dem rechten Teil von Abbildung 4 wird deutlich, wie Quecksilberverbindungen den Wasserfluss durch AQP1 inhibieren. Die Seitenkette von Cys 189 befindet sich in der Pore, und eine Blockierung dieser Position durch eine Quecksilberverbindung verstopft den Kanal.

Die Proteinfamilie der Aquaporine und Aquaglyceroporine

Schon während wir uns mit dem AQP1-Protein beschäftigten, begannen sich etliche andere Arbeitsgruppen weltweit für die – wie sich inzwischen herausgestellt hat – große Familie verwandter Proteine zu interessieren. Als Resultat dieser Forschungen ist heute die molekulare Struktur von zwölf Aquaporinhomologen aus Säugern bekannt, und einige hundert verwandte Proteine wurden in anderen Wirbeltieren, Weichtieren, Pflanzen und Einzellern identifiziert. Die Proteinhomologen aus Säugern lassen sich grob in zwei Klassen unterteilen (Abbildung 5): Die erste Klasse bilden die „klassischen Aquaporine“, von diesen wurde ursprünglich angenommen, dass sie ausschließlich permeabel für Wasser sind. Die zweite Klasse sind die „Aquaglyceroporine“, die permeabel für Wasser und Glycerin sind. Interessanterweise enthält *E. coli* mit AqpZ^[20] und GlpF Proteine aus beiden Klassen. Inzwischen weiß man, dass Aquaporine und Aquaglyceroporine an vielen physiologischen Prozessen beteiligt sind.

AQP1-Proteine in Nieren

Wir hatten Glück, dass wir eine Kollaboration mit Søren Nielsen an der Universität Aarhus aufbauen konnten, einem erstklassigen Mikroskopiker mit speziellen Kenntnissen in Nierenphysiologie. Jede unserer beiden Nieren enthält ungefähr eine Million Nephronen, deren Aufgabe darin besteht,

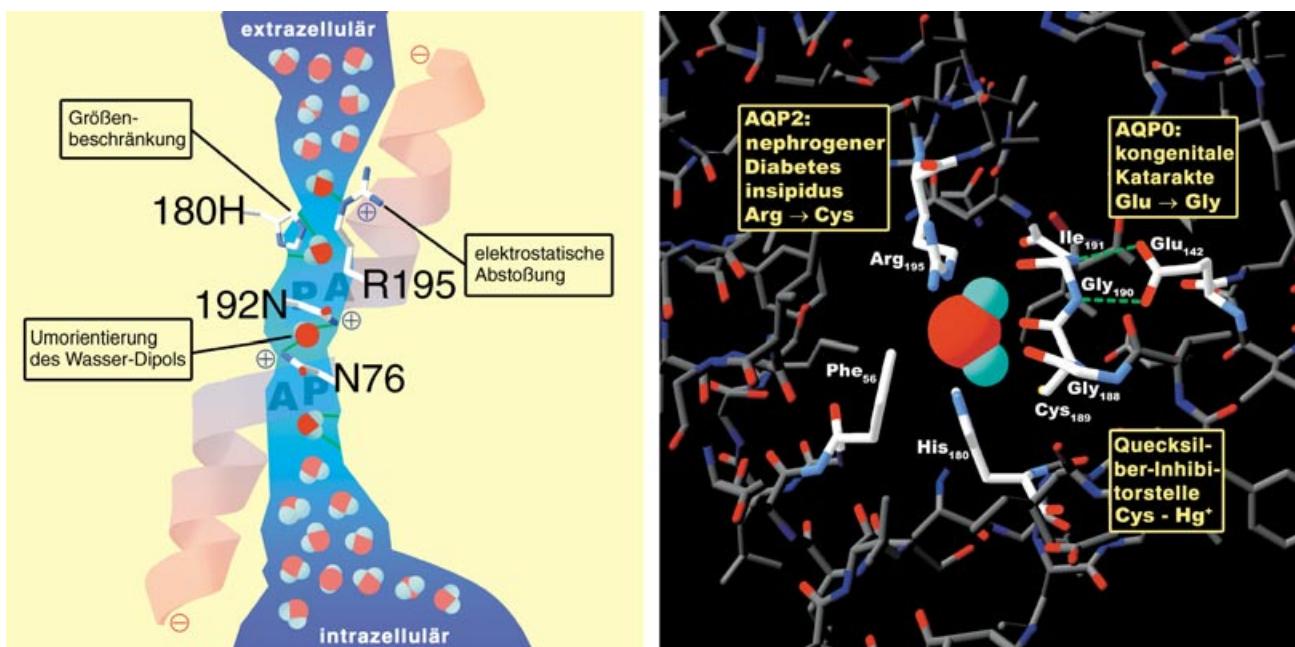


Abbildung 4. Der selektive Fluss von Wasser durch die AQP1-Untereinheit; die an menschlichen Krankheitszuständen beteiligten Aminosäurereste sind hervorgehoben. Links: Der Längsschnitt von AQP1 zeigt die mit flüssigem Wasser gefüllten extrazellulären und intrazellulären Kammern der Stundenglas-Struktur. Zwischen den Kammern befindet sich ein ca. 20 Å langes Verbindungsstück, durch das sich die Wassermoleküle einzeln bewegen; die entlang der Pore angeordneten Aminosäurereste verhindern die Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Wassermolekülen. Vermutlich verhindern zwei Strukturelemente die Permeation von Protonen (als H_3O^+): 1) Die positiv geladene Seitenkette des Argininrestes R195 an einer Engstelle von 2.8 Å bewirkt eine elektrostatische Abstoßung; 2) Wasserstoffbrücken mit den Seitenketten der beiden Asparaginsäurereste N192 und N76 in den NPA-Motiven führen zur Umorientierung des Dipols eines Wassermoleküls. Zwei den NPA-Motiven gegenüberliegende nicht-transmembrane α -Helices steuern zwei positive Partialladungen an der Kanalmitte bei. Rechts: Struktur der Pore mit dem Kalottenmodell eines Wassermoleküls an der engsten Stelle (Querschnitt). Hervorgehoben sind die Bindungsstellen für Quecksilberinhibitoren am Cysteinrest Cys189 in AQP1, die bei nephrogenem Diabetes insipidus auftretende Mutation in AQP2 (Arg → Cys) und die bei kongenitalen Katarakten auftretende Mutation in AQP0 (Glu → Gly). Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [19].

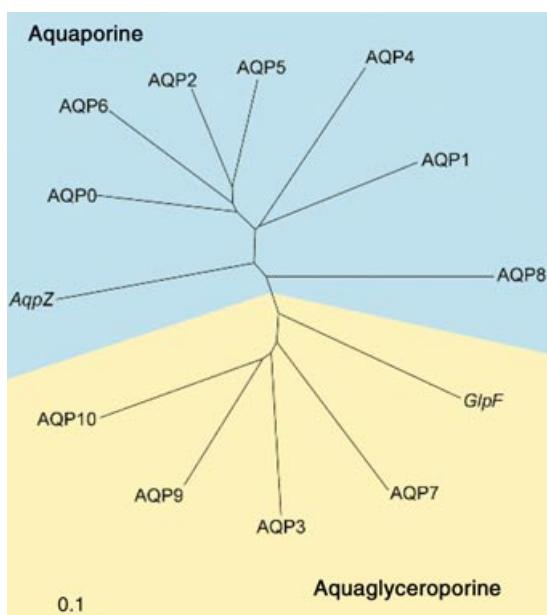


Abbildung 5. Die humanen Aquaporin-Gene lassen sich in zwei Klassen unterteilen: wasserpermeable Homologe (klassische Aquaporine, blau) und wasser- und glycerinpermeable Homologe (Aquaglyceroproteine, gelb). *E. coli* enthält ein Aquaporin (AqpZ) und ein Aquaglyceroporin (GlpF). Der Maßstab entspricht der genetischen Distanz zwischen Homologen. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [65].

Giftige Abfallprodukte zu eliminieren und den pH-Wert und den Ionengehalt des Blutes zu regulieren. Täglich werden ungefähr 180 Liter Plasma durch die Kapillargefäßbündel in den Nierenkörperchen filtriert. Wasser und bestimmte gelöste Stoffe des Primärfiltrats werden beim Durchgang der Flüssigkeit durch die Tubuli reabsorbiert. Die proximalen Tubuli und die dünnen Teile der absteigenden Schenkel der Henleschen Schleife haben hohe Permeabilitäten für Wasser; daraus ergibt sich ein Gegenstrommechanismus, der die Grundlage der Harnkonzentrierung in der Niere bildet. Dies sind auch genau die Komponenten, in denen AQP1 exprimiert wird. Die aufsteigenden Schenkel sind für bestimmte Ionen und kleine Moleküle permeabel, enthalten aber kein AQP1 und zeigen niedrige Permeabilitäten für Wasser. Die Nephronen entleeren ihren Inhalt in die Sammelrohre, die im nichtstimulierten Zustand niedrige Permeabilitäten für Wasser haben. Die Sammelrohre werden hoch permeabel für Wasser, wenn sie durch das antidiuretische Hormon (Vasopressin), das vom Gehirn bei Dehydratation freigesetzt wird, stimuliert werden.

Immunhistologische Analysen, die Søren Nielsen an Rattennieren durchführte, zeigten, dass die proximalen Tubuli und die dünnen Teile der absteigenden Schenkel extrem stark durch unser affinitätschromatographisch gereinigtes anti-AQP1 markiert werden.^[21] Der apikale Bürstensaum wird intensiv angefärbt, und unsere Analysen belegen,

dass die gesamte Bürstensaummembran zu etwa 4 % aus AQP1 besteht. Durch Immungold-Elektronenmikroskopie konnten wir nachweisen, dass AQP1 in großen Mengen an der Oberfläche der apikalen Bürstensaummembran vorkommt, wo die Reabsorption von Wasser stattfindet, aber nur in sehr geringen Mengen im Zellinneren (Abbildung 6, links).

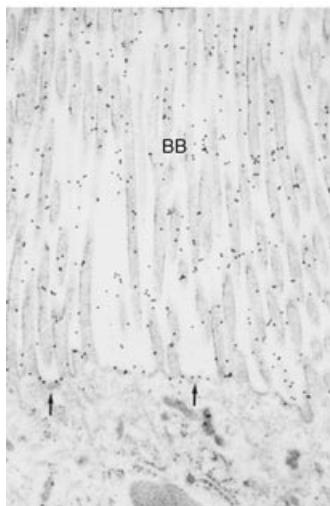
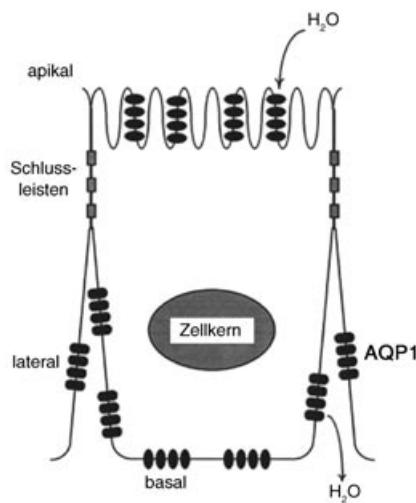


Abbildung 6. Subzelluläre Lokalisierung von AQP1 in den proximalen Tubuli von Rattenieren. Links: Unter dem Immungold-Elektronenmikroskop ($25\,000\times$) ist zu erkennen, dass der apikale Bürstensaum (BB), nicht aber der Zellkörper, durch anti-AQP1 markiert wird. Rechts: schematische Darstellung des Durchgangs von Wasser durch die Zelle: Wasser gelangt durch AQP1-Proteine im apikalen Bürstensaum in die Zelle und wird durch AQP1-Proteine in den basolateralen Membranen wieder ausgeschleust. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [21].

Somit war klar, dass AQP1 nicht aktiv aus dem Zellinneren zur Plasmamembran und zurück wandert. Auch in den basolateralen Membranen dieser Epithelzellen kommt AQP1 häufig vor. Somit verläuft die Reabsorption von Wasser aus dem tubulären Lumen auf einem transzellulären Weg durch die apikale Membran des tubulären Epitheliums und durch die basolaterale Membran in das Interstitium, wo es durch ebenfalls AQP1-reiche Kapillaren und Venolen absorbiert wird (Abbildung 6, rechts). Aufgrund der als Barriere wirkenden parazellulären Schlussleisten (tight junctions) findet normalerweise kein Wasseraustausch zwischen Zellen statt. Die Richtung des Wasserflusses durch diese Epithelzellen – vom Primärfiltrat zurück in den Vaskulärraum – wird durch kleine osmotische Gradienten geregelt, die von den Solutransportern aufrechterhalten werden; das Wasser folgt den Gradienten passiv.

AQP1-null-Phänotyp

Chulso Moon, einer unserer Studenten aus dem Graduiertenprojekt Humangenetik an der Johns Hopkins University, untersuchte das für humanes AQP1 codierende Strukturen, das wir durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) am



kurzen Arm von Chromosom 7 lokalisiert hatten.^[22] Wir suchten in Victor McKusicks Atlas nach verwandten Gensequenzen. Unser Kollege Colvin Redman vom New York Blood Center machte uns darauf aufmerksam, dass diese Position mit derjenigen eines interessanten Blutgruppensystems, der Colton(Co)-Antigene, übereinstimmt. Als Hämatologe bin ich sehr an Blutgruppenantigenen interessiert.

Hunderte von Blutgruppenantigenen sind bekannt: Sie repräsentieren multiple Polymorphismen in ungefähr 25 unterschiedlichen Blutgruppensystemen, die jeweils einen eigenen Genort bilden. Die Übereinstimmung der Lage des *AQP1*-Gens und eines menschlichen Blutgruppenantigens deutete somit stark darauf hin, dass beide dem gleichen Molekül entsprechen. Die Co-Blutgruppenantigene haben klinisch keine große Bedeutung, da die meisten Menschen der gleichen Co-Blutgruppe angehören – etwa 90 % sind reinerig bezüglich *Co^a*, fast 10 % sind mischerig bezüglich *Co^a* und *Co^b* und nur 0.3 % sind reinerig bezüglich *Co^b*. In Zusammenarbeit mit Forschern am International Blood Group Referencing Laboratory in Bristol, Großbritannien, fanden wir, dass sich die Co-Antigene durch einen Alanin-Valin-Polymorphismus am Rest 45, der sich an einer extrazellulären Position des AQP1-Proteins befindet, unterscheiden.^[23]

Überraschenderweise ist weltweit nur bei sehr wenigen Personen das Fehlen beider Co-Antigene diagnostiziert worden. Wir begannen uns für diese Co-null-Personen zu interessieren, und sammelten, mit Unterstützung von John Moulds und Jean Pierre Cartron, DNA, Blut und Urin von drei Gruppen von Co-null-Blutsverwandten. Alle Probanden waren Frauen, die offenbar während des Geburtsvorgangs gegen die Co-Antigene auf den roten Blutzellen ihrer Neugeborenen sensibilisiert worden waren. Wir stellten die Hypothese auf, dass die AQP1 codierenden Gene dieser Frauen Mutationen aufweisen. Da sich die Probandinnen aus allen drei Gruppen als reinerig bezüglich einer spezifischen Schädigung des *AQP1*-Gens erwiesen,^[24] exprimierten sie AQP1 weder in den roten Blutzellen noch in den Nierentubuli und wahrscheinlich auch nicht im Choroid Plexus, im Ziliarepithel oder in irgendeinem anderen Gewebe, in dem das Protein normalerweise gefunden wird. Die Probandinnen zeigen jedoch keinerlei klinische Symptome. Wegen ihrer einzigartigen Blutgruppen können sie keine Fremdtransfusionen erhalten, sodass jede tiefgefrorene Eigenblut in örtlichen Blutbanken für Notfälle oder chirurgische Eingriffe aufbewahrt.

Das Fehlen klinischer Symptome ließ darauf schließen, dass AQP1 für den menschlichen Metabolismus entweder gar nicht oder nur in bestimmten physiologischen Zuständen oder klinischen Verfassungen wichtig ist. Alan Verkman an der UCSF und Wissenschaftler der NIH entdeckten bei Studien an Mäusen mit gezielter Schädigung des für AQP1 codierenden Gens, dass AQP1 wichtig für die Harnkonzentrierung in der Niere ist.^[25,26] Unser Kollege Landon King an

der Johns Hopkins University entwickelte eine klinische Testserie, um die Bedeutung des menschlichen AQP1-Proteins zu eruiieren. Zwei AQP1-null-Personen wurden im General Clinical Research Center am Johns Hopkins Hospital stationär untersucht. Die Permeabilität für Wasser ist bei roten Blutzellen von AQP1-null-Personen deutlich reduziert, Untersuchungen lieferten aber normale Befunde für alle Basiswerte. Landon führte daraufhin einen einfachen Test durch – er ließ die Patienten dursten. Jede Nacht werden wir ein wenig dehydratisiert; aus diesem Grund schmeckt uns der Orangensaft zum Frühstück besonders gut. Um uns gegen Dehydratation zu schützen, konzentrieren unsere Nieren den Urin auf einen Maximalwert von normalerweise etwa $1000 \text{ mosmol L}^{-1}$ auf. Bei den AQP1-null-Probanden wurden nach einer Nacht ohne Flüssigkeitszufuhr Konzentrationen von höchstens $450 \text{ mosmol L}^{-1}$ gemessen. Längerer Flüssigkeitsentzug (24 h) mit anschließender Verabreichung von antidiuretischem Hormon (Vasopressin) und Infusion von hypertönischem Natriumchlorid ergab keine Steigerung der Osmolarität.^[27] Bei unserem modernen Lebensstil – mit Klimaanlagen und ungehindertem Zugang zu Wasser – ist es nicht lebenswichtig, Osmolaritäten von über $450 \text{ mosmol L}^{-1}$ aufzubauen. In einer Umgebung mit Flüssigkeitsmangel, wie sie unseren Vorfahren sicher oft zu schaffen gemacht hat, wären AQP1-null-Personen allerdings gefährdet. Bei den AQP1-null-Patienten tritt eine milde Form von nephrogenem Diabetes insipidus auf, die physiologisch ausgeprägt ist, aber gewöhnlich subklinisch verläuft.

Søren Nielsen stellte weiterhin fest, dass AQP1 extrem häufig in den Kapillaren der luminalen und abluminalen endothelialen Membranen vorkommt.^[28,29] Landon King und Robert Brown^[30] bestimmten die Permeabilität der Kapillaren bei AQP1-null-Probanden mit einer von Wayne Mitzner und Elias Zerhouni an der Johns Hopkins University entwickelten Technik, die auf hochauflösende Lungentomographie zurückgreift. Dabei wurden durch Fokussierung auf kleine Bronchiolen von 2 bis 3 mm Durchmesser die Querschnittsflächen der benachbarten Venolen vermessen und die Wandstärken bestimmt. Nach der schnellen Infusion von drei Litern Kochsalzlösung wurden die Scans wiederholt. Normale und AQP1-null-Probanden zeigten nach der Infusion von Kochsalzlösung vergleichbare Symptome einer Vasoregulationsstörung. Bei den normalen Probanden beobachteten wir eine Zunahme der Wandstärken der Tubuli. Dies kommt dadurch zustande, dass Flüssigkeit aus den Venolen freigesetzt wird und sich im Weichgewebe um die Bronchiolen ansammelt, wie im Anfangsstadium eines Lungenödems. Während bei sämtlichen normalen Probanden ein interstitielles Ödem im Peribronchium auftrat, erwiesen sich die AQP1-null-Probanden als resistent, was wir als einen klaren Hinweis auf eine beträchtlich reduzierte Gefäßpermeabilität werteten. Ob sich dieser Effekt günstig oder schädlich auswirkt, hängt von den klinischen Umständen ab. Bei der Geburt verwandeln sich die Lungen von einem sekretorischen Organ in ein absorptives Organ. Wir nehmen an, dass ein fehlender Flüssigkeitstransfer vom Lungeninterstitium in den Gefäßraum bei Neugeborenen sehr schädlich ist; das würde erklären, warum der AQP1-null-Phänotyp so selten ist.

Andere Aquaporine – AQP2 im Sammelrohr

Bereits wenige Wochen nach unseren ersten Studien begannen verschiedene Arbeitsgruppen mit der Suche nach weiteren Aquaporinen. Sei Sasaki und Mitarbeiter an der Tokyo Medical and Dental University konnten im Zuge ihrer Untersuchungen zum Nierensammelrohr eine cDNA isolieren, die für das Aquaporin AQP2 codiert.^[31] Søren Nielsen et al. stellten fest, dass AQP2 primär in Sammelrohrzellen exprimiert wird, in denen bekanntermaßen eine regulierte Wasserpermeabilität auftritt.^[32] Obwohl meine Arbeitsgruppe an den Studien zu AQP2 nicht beteiligt war, möchte ich im Folgenden die wichtigsten Ergebnisse diskutieren, da ich ihre klinische Bedeutung sehr hoch einschätze.

In einer maßgeblichen Studie untersuchten Søren Nielsen und Mark Knepper AQP2 in Sammelrohrzellen aus Ratten.^[33] Die Sammelrohre wurden durchschwemmt, und die Permeabilität für Wasser wurde gemessen. Einige Exemplare wurden aufgeschnitten und mit anti-AQP2 angefärbt. Durch Immungold-Elektronenmikroskopie wurde nachgewiesen, dass in der apikalen Plasmamembran der Sammelrohr-Hauptzellen nur wenig AQP2 vorliegt, in den Membranen der intrazellulären Vesikeln dagegen das meiste Protein gefunden wird (Abbildung 7, links oben). Nach Zusatz von physiologischen Konzentrationen Vasopressin stieg die Permeabilität für Wasser auf das Fünffache; dies entspricht dem erwarteten Anstieg bei einem entsprechenden physiologischen Prozess. Immungold-elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass das AQP2-Protein zur apikalen Plasmamembran gewandert war (Abbildung 7, links unten). Beim Abbau des Vasopressins kehrt das AQP2 wieder ins Zellinnere zurück und die Permeabilität sinkt.

Diese Schwankungen in der Permeabilität der Nierensammelrohre erfahren wir täglich am eigenen Leib: Unsere Studenten feiern beispielsweise jeden Freitagabend den Beginn des Wochenendes mit einer kleinen Party am Institut. Ein Student, der dabei zwei Liter Bier trinkt, sammelt überschüssige Flüssigkeit an, denn der Alkohol inhibiert die Freisetzung von Vasopressin durch das Gehirn. Dies führt dazu, dass AQP2 in den intrazellulären Vesikeln verbleibt und die apikalen Membranen der Sammelrohr-Hauptzellen kein Wasser aus dem Filtrat reabsorbieren können (diuretischer Zustand). Nach der Party geht der Student erst einmal auf die Toilette, wo er sich großer Mengen verdünnten Urins entledigt, und am nächsten Morgen liegt er leicht dehydratisiert und mit einem hohen Vasopressinspiegel im Bett. Unter diesen Umständen wandert AQP2 zur apikalen Plasmamembran, und die Reabsorption von Wasser aus dem Urin wird maximiert. Beim Aufwachen ist der Urin entsprechend hoch konzentriert (antidiuretischer Zustand). Dieser Zyklus aus diuretischem und antidiuretischem Zustand kann sich im Laufe eines Tages mehrfach wiederholen.

Kurzgefasst bindet Vasopressin an die V2-Rezeptoren an der basolateralen Membran des Nierensammelrohrs und aktiviert eine G-Protein-gekoppelte Adenylylcyclase-Kaskade, die eine durch Proteinkinase A vermittelte Phosphorylierung des Rests 256 im C-Terminus von AQP2 verursacht. Das Protein inseriert anschließend in die apikale Plasmamembran, wie es durch Nielsen und Knepper, die Arbeitsgruppen

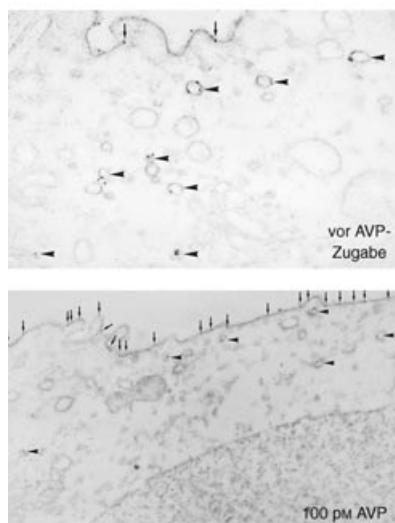
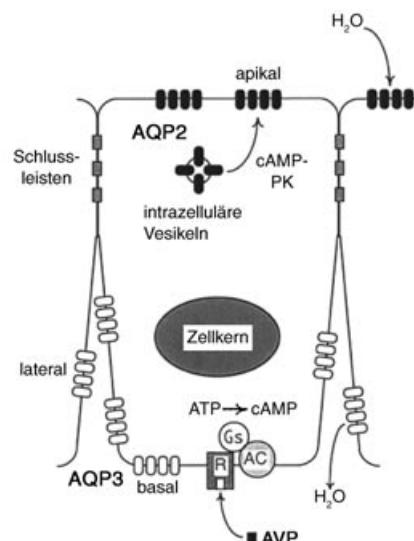


Abbildung 7. Subzelluläre Lokalisierung von AQP2 in Sammelrohr-Hauptzellen aus Rattennieren. Links: Anti-AQP2-Immungold-Elektronenmikroskopie eines isolierten Sammelrohrs aus der Ratteniere. Vor der Stimulation mit Vasopressin (AVP) werden vor allem Markierungen an den intrazellulären Vesikeln beobachtet (oben, 25 000×). Nach Stimulation mit 100 pm AVP finden sich die meisten Markierungen an der apikalen Membran (unten, 15 000×). Rechts: Schematische Darstellung der AVP-abhängigen Exozytose von AQP2 zur apikalen Membran von Hauptzellen: Eintritt durch AQP2 in der apikalen Membran; Ausschleusung durch AQP3 (oder AQP4) in basolateralen Membranen. Wiedergabe in veränderter Form mit Genehmigung aus Lit. [33a] und [33b].



AQP6 in Säure sekretierenden Zellen

An diesem Punkt – gerade als wir dachten, wir wüssten eine Menge über Aquaporine – erwartete uns eine Überraschung. Studien ergaben, dass AQP6, ein mit AQP2 genetisch eng verwandtes Protein, ein sehr schlechter Wasserkanal ist und nie in der Plasmamembran vorkommt. Søren Nielsen und Tae-Hwan Kwon konnten durch Immungold-Elektronenmikroskopie mit Doppelmarkierung nachweisen, dass AQP6 zusammen mit H⁺-ATPase in intrazellulären Vesikeln von α-intercalierten Zellen des Nierensammelrohrs lokalisiert ist. Bei Stimulation der Säuresekretion wandert H⁺-ATPase durch Exozytose zur Plasmamembran, während AQP6 im Inneren der Zelle verbleibt. Eine zweite Überraschung war, dass AQP6 bei niedrigen pH-Werten ein sehr guter Anionenkanal ist und insbesondere Nitrat gut leitet.^[36] Somit ist AQP6 genetisch zwar eindeutig ein Mitglied der Aquaporinfamilie, es hat aber eine grundlegend verschiedene physiologische Funktion.

um Deen in Nimwegen, Dennis Brown in Boston, Sasaki in Tokio, Anita Aperia in Stockholm und andere ermittelte wurde. Wasser aus dem Primärurin gelangt durch AQP2 in der apikalen Membran in die Zelle und wird durch andere Aquaporine in der basolateralen Membran (AQP3 oder AQP4) in den Gefäßraum ausgeschleust. Auf seinem Weg vom Lumen in den Gefäßraum wandert das Wasser somit durch die Zellen (siehe hierzu den Aufsatz von Nielsen et al.^[34]).

Angeborene AQP2-Defekte verursachen sehr seltene, aber schwerwiegende klinische Probleme. Diese Befunde gehen auf Carel van Os, Peter Deen und Mitarbeiter in Nimwegen zurück.^[35] Die Patienten sind hochgradig beeinträchtigt: In einigen Fällen produzieren sie täglich bis zu zwanzig Liter Urin. Erworbbene Defekte der AQP2-Expression sind relativ verbreitet. Bei zu hohen AQP2-Spiegeln tritt eine Flüssigkeitsretention auf (nachgewiesen durch Nielsen und Knepper sowie durch Robert Schrier und Mitarbeiter an der University of Colorado). Vorwiegend betroffen sind offenbar Patienten mit Myokardinfarkt, die häufig unter Flüssigkeitsretention und, als Folge davon, unter einer Beeinträchtigung der Lungenfunktion leiden. Auch während der Schwangerschaft kann eine pathologische Flüssigkeitsretention mit Bluthochdruck und neurologischen Störungen als Symptome auftreten. Zu niedrige AQP2-Spiegel führen hingegen zu einer ungenügenden Konzentrierung des Urins. Dies wurde bei Patienten nach Aufhebung eines Harnstaus festgestellt (durch Jørgen Frøkjaer in Aarhus) sowie bei Patienten mit nocturnaler Enuresis (durch Ivana Valenti in Bari). AQP2 hat somit eine große Bedeutung in der klinischen Medizin (siehe den Aufsatz von Nielsen et al.^[34]).

AQPo in Augenlinsen

Ein weiteres Mitglied der Aquaporinfamilie ist AQPo, das ausschließlich in den Faserzellen der Augenlinsen exprimiert wird. AQPo wurde schon vor über 30 Jahren entdeckt – damals als MIP (major intrinsic protein) bezeichnet –, seine physiologische Funktion wurde aber nicht aufgeklärt. AQPo hat eine relativ niedrige Permeabilität für Wasser und, wie Andreas Engel und Mitarbeiter vorschlugen, möglicherweise eine zweite Funktion bei der Verknüpfung von Zellen.

Shomi Bhattacharya vom Moorefield's Eye Hospital in London identifizierte zwei große Gruppen von Blutsverwandten mit dominant vererbten kongenitalen Katarakten mit absoluter Manifestationswahrscheinlichkeit. Katarakte sind bei älteren Menschen relativ verbreitet, bei Kindern aber sehr selten. Jede Familie hatte eine Missense-Mutation in einem strukturell wichtigen Aminosäurerest entwickelt, und es traten unterschiedliche Arten von Trübungen auf.^[37] Bei Mitgliedern der einen Familie war ein essenzieller Threoninrest durch einen Argininrest ersetzt (Thr-138-Arg); diese Patienten wiesen verteilt über die gesamte Augenlinse zahlreiche Trübungen auf. Die Mitglieder der zweiten Familie, bei denen ein essenzieller Glutamatrest durch einen Glycinrest ersetzt war (Glu-134-Gly), zeigten eine einzelne lamellare Trübung im Zentrum der Linse. Die Größe der Trübung entsprach der Größe der Linse zum Zeitpunkt der Geburt, was darauf hindeutet, dass sich die Mutation ausschließlich bei der Geburt auswirkt.^[38] Dieses Beispiel veranschaulicht, dass die Biologie des Menschen weitaus komplexer ist als einfache Gendisruptionsstudien an Mäusen uns glauben.

machen. Da die Faserzellen von Augenlinsen Jahrzehnte halten, ist anzunehmen, dass bereits geringfügige Polymorphismen im AQP0-Protein ein Risikofaktor für die Entwicklung von Alterskatarakten sind.

AQP4 im Gehirn

AQP4 wird in vielen unterschiedlichen Geweben exprimiert, unter anderem auch im Gehirn.^[39] Anders als die relativ undichten peripheren Kapillaren sind Gehirnkapillaren durch umhüllende astrogliale Endfüße weitgehend verschlossen. In Zusammenarbeit mit Ole Petter Ottersen und Mitarbeitern an der Universität Oslo sowie Søren Nielsen wurde das Protein durch Immungold-Elektronenmikroskopie an der Blut-Hirn-Schranke lokalisiert, dort, wo Gefäßraum und Hirnparenchym aneinandergrenzen.^[40,41] Die Gehirnkapillaren sind von einer Basalmembran umschlossen, die wiederum von astroglialen Endfüßen umgeben ist. Das AQP4 befindet sich fast vollständig in den Endfußmembranen in direktem Kontakt mit der Basalmembran und tritt in anderen astroglialen Membranen praktisch nicht auf (Abbildung 8 a,b).

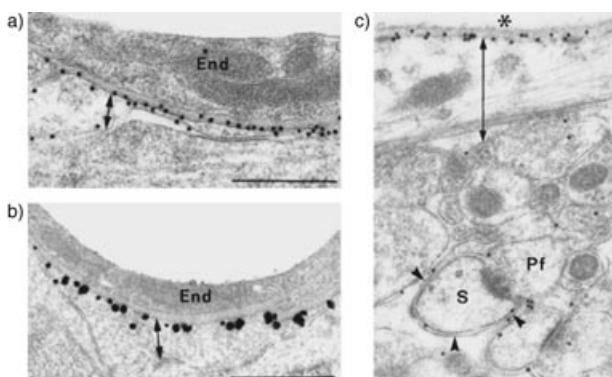


Abbildung 8. Polarisierte Exprimierung von AQP4 in Rattenhirn, visualisiert durch Anti-AQP4-Immungold-Elektronenmikroskopie. a, b) AQP4 kommt in perivaskulären Membranen von astroglialen Endfüßen vor, nicht aber in Membranen am Neuropil. c) Markierung der Pia mater auf der Hirnoberfläche. Maßstab 0.5 µm. End Endothel, Pf Parallelfasern, S Dorn der Purkinje-Zellen, * piale Oberfläche. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [40].

Auf ähnliche Weise kommt AQP4 häufig an der Hirnoberfläche an der Grenzfläche zwischen Hirnflüssigkeit und Hirnmasse vor (Abbildung 8c). Diese Lokalisierung wird als starker Hinweis dafür angesehen, dass AQP4 eine wichtige Rolle für den Wasserfluss aus dem Blut oder aus der Gehirnrückenmarks-Flüssigkeit in das Gehirn und umgekehrt spielt. In diesen Bereichen werden sehr großen Mengen AQP4 exprimiert, das quadratische mikrokristalline Aggregate („square arrays“) bildet, deren Größe vom N-Terminus von AQP4 bestimmt wird.^[42] Andere Forscher, darunter Antonio Frigeri in Bari, postulierten eine mögliche pathophysiologische Bedeutung des Wasserflusses im Gehirn und in Skelettmuskeln.^[43]

Unser Student John Neely erkannte ein Proteinbindungs-motiv im C-Terminus von AQP4, das als potenzieller Bindungspartner der Dystrophin-assoziierten Proteine infrage kam. Zusammen mit Marv Adams und Stan Froehner in Seattle sowie mit unseren Kollegen in Oslo lokalsierten wir AQP4 in Mäusen, die eine gezielte Disruption in dem Dystrophin-assoziierten Protein α -Syntrophin (Syn) aufwiesen.^[44] Durch Immungold-Elektronenmikroskopie konnten wir nachweisen, dass AQP4 in Syn-null-Tieren stark fehllokalisiert ist. Nach Herbeiführen einer Hirnverletzung (durch Verschluss der mittleren Zerebralarterie) zeigte sich interessanterweise, dass die Kontrolltiere größere Infarktbereiche und Ödeme entwickelten als die Syn-null-Tiere.^[45] Diese Studien führten zu dem Schluss, dass bei Patienten mit Hirnverletzungen die Folgen einer Hirnschwellung durch selektive Inhibition von AQP4 eingedämmt werden könnten. Die Wirkung gegen eine Hyponatriämie-bedingte Hirnschwellung wurde durch Søren Nielsen und Mitarbeiter beobachtet.^[46] Unabhängig davon erhielten Geoff Manley und Mitarbeiter die gleichen Ergebnisse bei AQP4-null-Mäusen.^[47]

AQP5 in Drüsen

AQP5 kommt in der apikalen Membran der Drüsenendstücke von Speichel-, Tränen-, Schweiß- und anderen Drüsen vor.^[48,49] Dies ist die letzte Membran, die das Wasser während der Produktion von Speichel, Tränen und anderen Sekreten durchquert. Wie wir wissen, können diese Drüsen große Mengen an Flüssigkeit freisetzen. Zum Beispiel produzieren wir nach mehreren Stunden ohne Nahrungsaufnahme große Mengen Speichel, sobald wir Essbares wahrnehmen.

AQP5 könnte bei bestimmten klinischen Störungen eine Rolle spielen. Zusammen mit Kazuo Tsubota in Tokio und Chris Delpote in Brüssel untersuchten wir die Verteilung von AQP5 in den Drüsen von Patienten mit Sjögren-Syndrom. Diese Störung, die vor allem bei Frauen im mittleren Alter auftritt, äußert sich in trockenen Augen und einem trockenen Mund, ihre genaue biologische Ursache ist aber unbekannt. In immunhistochemischen Markierungsstudien mit anti-AQP5 blieb die normalerweise beobachtete Anfärbung der apikalen Membran aus, und das Protein scheint über das gesamte Cytoplasma fehllokalisiert zu sein.^[50,51] In anderen Studien an einer größeren Gruppe von Sjögren-Patienten fanden Roland Jonsson und Mitarbeiter in Bergen hingegen keine Fehllokalisierung; die Autoren stellten aber eine verminderte Exprimierung von AQP1 in den die Drüsenendstücke umgebenden Myoepithelien fest.^[52] Das Sjögren-Syndrom dürfte somit zwar heterogen sein, eine Beteiligung von Aquaporinen wurde aber in beiden Studien nachgewiesen.

Auch die Schweißdrüsen enthalten größere Mengen AQP5. In einer weiteren gemeinsamen Studie mit Søren Nielsen und Mitarbeitern verglichen wir qualitativ die Schweißabsonderung bei Wildtyp-Mäusen und Mäusen mit einer Disruption des für AQP5 codierenden Gens (präpariert durch Carissa Krane und Anil Menon an der University of Cincinnati). Die Morphologie der Schweißdrüsen blieb bei den gendefekten Tieren erhalten, die Freisetzung von Amy-

lase im Schweiß nach Injektion von Pilocarpin war aber stark vermindert. Daraus folgt, dass AQP5 wichtig für die Schweißabsonderung sein muss.^[53]

Die Aquaglyceroporine AQP7 und AQP9

AQP7 wird in Adipocyten exprimiert. Bei Nahrungsentzug werden in Form von Triglyceriden gespeicherte Fettsäuren und Glycerin als Energiequellen freigesetzt. Den Export der Fettsäuren aus der Zelle übernehmen spezielle Fettsäuretransporter, Glycerin wird durch AQP7 ausgeschleust. Glycerin, das bevorzugte Substrat der Gluconeogenese, passiert durch AQP9 die Plasmamembranen der Hepatocyten, in denen es anschließend in Glucose umgewandelt wird. Wie Jennifer Carbrey und Dan Gorelick aus unserer Arbeitsgruppe nachweisen konnten, wird AQP9 im Fastenzustand verstärkt exprimiert. Zahlreiche andere Forschergruppen kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass AQP7 und AQP9 eine entscheidende Funktion beim Energietransfer und der Aufrechterhaltung des Glucosespiegels im Blut haben.^[54,55]

Barry Rosen und Mitarbeiter entdeckten an der Wayne State University, dass AQP7 und AQP9 die bemerkenswerte Eigenschaft haben, bestimmte Schwermetalle zu transportieren.^[56] An AQP7- und AQP9-exprimierenden Hefen und Oocyten wurde die Arsen(III)-oxid-Aufnahme gemessen. Arsen(III)-oxid ist sehr giftig und bei neutralen pH-Werten ungeladen. Zu den klinischen Befunden einer Arsenvergiftung zählen Leberschäden und -karzinome. Die Weltgesundheitsorganisation macht derzeit auf eine alarmierende Verbreitung von Arsenvergiftungen im Gangesdelta durch kontaminiertes Grundwasser aufmerksam. Weil das Oberflächenwasser mit *Vibrio cholera* verseucht ist, wurden Röhrenbrunnen installiert, der Schwermetallgehalt im Grundwasser wurde aber offenkundig nicht bestimmt. Unsere Forschungen erklären zwar, warum die betroffenen Menschen anfällig gegen Leberschäden sind, ein wirksames Gegenmittel liefern sie aber nicht. Um diese Vergiftungen zu verhindern, muss reines Trinkwasser zugänglich gemacht werden – ein Grundrecht, das allen Menschen zusteht.

Nichthumane Aquaporine

Aquaporine üben auch in Pflanzen wichtige Funktionen aus. Eine in der Pflanzenphysiologie häufig untersuchte Spezies ist *Arabidopsis thaliana*, eine Verwandte der Senfblume. Eindrucksvoll belegt wurde die Funktion der Aquaporine durch Ralf Kaldenhoff und Mitarbeiter an der Universität Würzburg. In diesen Studien wurde die Morphologie einer *Arabidopsis*-Mutterpflanze mit einer modifizierten Pflanze verglichen, die nur 20 % des normalen Niveaus an der in den Wurzeln vorkommenden Aquaporin-Gruppe PIP1b exprimierte. Beide Pflanzen zeigten ein ähnliches Blattwerk, um aber die gleichen Halmdicke zu erreichen, musste die modifizierte Pflanze ein stärker verästeltes Wurzelwerk entwickeln (Abbildung 9).^[57] Das zeigt, welchen Stellenwert die Wasserzufluss bei Pflanzen einnimmt. *Arabidopsis thaliana* weist mindestens 35 unterschiedliche



Abbildung 9. Wurzelwerk von *Arabidopsis thaliana*. Rechts: Wildtyp; links: Aqp-PIP1b-defiziente Pflanze. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [57].

Aquaporin-Gene auf, die vermutlich an verschiedenen physiologischen Prozessen wie der Photosynthese (Durchtritt von Kohlendioxid durch Blattaquaporine)^[58] oder der Aufnahme von Wasser durch die Wurzeln beteiligt sind.^[59] Diese Befunde könnten auch für humane Aquaporine relevant sein, da ähnliche Beobachtungen für AQP1^[60] und AQP3^[61] beschrieben wurden.

Aquaporine werden auch in allen Klassen von Mikroorganismen exprimiert. *E. coli* enthält das Aquaporin AqpZ und das Aquaglyceroporin GlpF, die sich hinsichtlich der Strukturen der schmalsten Stelle etwas unterscheiden: Bei den Aquaporinen ist sie gewöhnlich enger und hydrophiler als bei den Aquaglyceroproteinen. Archaea tragen ebenfalls ein Gen, das für AqpM, ein Homolog von Aquaporinen und Aquaglyceroporinen, codiert. Möglicherweise vermittelt AqpM jedoch nicht den Transport von Wasser, sondern von Schwefelwasserstoff.^[62] Gleich welche Funktion Aquaporine im Einzelnen ausüben: Die Tatsache, dass sie in allen drei Lebensräumen vorkommen, untermauert die fundamentale Bedeutung dieser Proteinklasse. *Saccharomyces cerevisiae* enthält zwei Aquaporin-Gene und zwei Aquaglyceroporin-Gene. Untersuchungen durch Stefan Hohmann an der Universität Göteborg ließen interessante Funktionen erkennen: Aquaporine aus Hefe verleihen Kälteresistenz, und das Aquaglyceroporin FPS1 schützt den Organismus vor einem hypoosmotischen Schock.^[63]

Zusammenfassung

Mit der Entdeckung der Aquaporine konnte erklärt werden, wie Wasser durch die Plasmamembranen von Zellen gelangt, Protonen aber ausgeschlossen bleiben. Einige Homologe haben spezielle Permeationseigenschaften für Glycerin, Nitrat oder Arsen(III)-oxid. Die Strukturen der Aquaporine liefern uns bemerkenswert detaillierte Informationen über ihre biophysikalischen Funktionen. Aquaporine wurden mit einer Vielzahl von Krankheiten in Verbindung gebracht. Sie sind nachweislich an einigen Gefäßerkrankungen der Niere, einschließlich des nephrogenen Diabetes insipidus, beteiligt. Außerdem wird vermutet, dass ihnen

eine Funktion beim Schutz vor Überhitzung zukommt. In Frankreich starben während der Hitzewelle im vergangenen Sommer bei Temperaturen über 40°C 14000 Menschen. Hauptsächlich betroffen waren ältere Personen, bei denen sehr wahrscheinlich physiologische Prozesse beeinträchtigt waren, an denen Aquaporine beteiligt sind (Urinkonzentrierung, Schwitzen, Durstmechanismen). Diese Mangelfunktionen mögen im Alltagsleben unbedeutend sein, bei großer Hitze können sie aber schwerwiegende Folgen haben. Aquaporine wurden auch mit Gehirnödemen und Sehverlust in Verbindung gebracht, Aquaglyceroporine regulieren den Energiehaushalt und schützen so vor dem Verhungern. Diese Proteine haben einen festen Platz in der gesamten belebten Natur.

„In summary, there are no small problems. Problems that appear small are large problems that are not understood.“^[64] – Dieses Zitat, das Santiago Ramón y Cajal, der Vater der Neurowissenschaften, seinen Schülern mitgab, trifft auch hier zu: Die Wasserpermeation durch Membranen war ursprünglich als ein kleines Problem betrachtet worden, und man hatte wohl geglaubt, es handele sich um einen einfachen diffusiven Mechanismus. Tatsächlich aber hat sich gezeigt, dass sich dahinter ein komplexer Prozess von großer physiologischer und pathophysiologischer Bedeutung verbirgt.

Ich danke meinen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern und den vielen Kollegen, die mit uns zusammengearbeitet haben. Besonders danke ich Victor McKusick am Department of Medicine und M. Daniel Lane am Department of Biological Chemistry, die mich in ihre Fakultät berufen haben. Ich widme diesen Vortrag dem Gedenken an John C. Parker, einen Freund und großzügigen Mentor.

Eingegangen am 27. Mai 2004
Übersetzt von Dr. Frank Maaß, Weinheim

- [1] A. Finkelstein, *Water Movement Through Lipid Bilayers, Pores, and Plasma Membranes: Theory and Reality*, New York, Wiley, 1987.
- [2] „Inhibition of water and solute permeability in human red cells“: R. I. Macey, R. E. L. Farmer, *Biochim. Biophys. Acta* **1970**, 211, 104–106.
- [3] „Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel“: P. Agre, G. M. Preston, B. L. Smith, J. S. Jung, S. Raina, C. Moon, W. B. Guggino, S. Nielsen, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **1993**, 265, F463–F476.
- [4] „Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules“: B. M. Denker, B. L. Smith, F. P. Kuhajda, P. Agre, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 15634–15642.
- [5] „Erythrocyte Mr 28000 transmembrane protein exists as a multisubunit oligomer similar to channel proteins“: B. L. Smith, P. Agre, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 6407–6415.
- [6] „Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family“: G. M. Preston, P. Agre, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 11110–11114.
- [7] „Appearance of water channels in Xenopus oocytes expressing red cell CHIP28 protein“: G. M. Preston, T. P. Carroll, W. B. Guggino, P. Agre, *Science* **1992**, 256, 385–387.
- [8] „Aquaporins: a family of water channel proteins“: P. Agre, S. Sasaki, J. Chrispeels, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **1993**, 265, F461.
- [9] „Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein“: M. L. Zeidel, S. V. Ambudkar, B. L. Smith, P. Agre, *Biochemistry* **1992**, 31, 7436–7440.
- [10] „Ultrastructure, pharmacologic inhibition, and transport selectivity of aquaporin channel-forming integral protein in proteoliposomes“: M. L. Zeidel, S. Nielsen, B. L. Smith, S. V. Ambudkar, A. B. Maunsbach, P. Agre, *Biochemistry* **1994**, 33, 1606–1615.
- [11] „The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel“: G. M. Preston, J. S. Jung, W. B. Guggino, P. Agre, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 17–20.
- [12] „Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model“: J. S. Jung, G. M. Preston, B. L. Smith, W. B. Guggino, P. Agre, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 14648–14654.
- [13] „Biologically active two-dimensional crystals of aquaporin CHIP“: T. Walz, B. L. Smith, M. L. Zeidel, A. Engel, P. Agre, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 1583–1586.
- [14] „Structural determinants of water permeation through aquaporin-1“: K. Murata, K. Mitsuoka, T. Hirai, T. Walz, P. Agre, J. B. Heymann, A. Engel, Y. Fujiyoshi, *Nature* **2000**, 407, 599–605.
- [15] „Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity“: D. Fu, A. Libson, L. J. Miercke, C. Weitzman, P. Nollert, J. Krucinski, R. M. Stroud, *Science* **2000**, 290, 481–486.
- [16] „Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel“: H. Sui, B. G. Han, J. K. Lee, P. Walian, B. K. Jap, *Nature* **2001**, 414, 872–878.
- [17] „Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF“: B. L. de Groot, H. Grubmüller, *Science* **2001**, 294, 2353–2357.
- [18] „Control of the selectivity of the aquaporin water channel family by global orientational tuning“: E. Tajkhorshid, P. Nollert, M. O. Jensen, L. J. Miercke, H. O’Connell, R. M. Stroud, K. Schulten, *Science* **2002**, 296, 525–530.
- [19] „Aquaporin water channels: atomic structure and molecular dynamics meet clinical medicine“: D. Kozono, M. Yasui, L. S. King, P. Agre, *J. Clin. Invest.* **2002**, 109, 1395–1399.
- [20] „Molecular cloning and characterization of AqpZ, a water channel from *Escherichia coli*“: G. Calamita, W. R. Bishai, G. M. Preston, W. B. Guggino, P. Agre, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 29063–29066.
- [21] „CHIP28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron“: S. Nielsen, B. L. Smith, E. I. Christensen, M. A. Knepper, P. Agre, *J. Cell Biol.* **1993**, 120, 371–383.
- [22] „The human aquaporin-CHIP gene. Structure, organization, and chromosomal localization“: C. Moon, G. M. Preston, C. A. Griffin, E. W. Jabs, P. Agre, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 15772–15778.
- [23] „Human red cell aquaporin CHIP. I. Molecular characterization of ABH and Colton blood group antigens“: B. L. Smith, G. M. Preston, F. A. Spring, D. J. Anstee, P. Agre, *J. Clin. Invest.* **1994**, 94, 1043–1049.
- [24] „Mutations in aquaporin-1 in phenotypically normal humans without functional CHIP water channels“: G. M. Preston, B. L. Smith, M. L. Zeidel, J. J. Moulds, P. Agre, *Science* **1994**, 265, 1585–1587.
- [25] „Defective proximal tubular fluid reabsorption in transgenic aquaporin-1 null mice“: J. Schnermann, C. L. Chou, T. Ma, T. Traynor, M. A. Knepper, A. S. Verkman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 9660–9664.
- [26] „Reduced water permeability and altered ultrastructure in thin descending limb of Henle in aquaporin-1 null mice“: C. L. Chou,

- M. A. Knepper, A. N. van Hoek, D. Brown, B. Yang, T. Ma, A. S. Verkman, *J. Clin. Invest.* **1999**, *103*, 491–496.
- [27] „Defective urinary-concentrating ability due to a complete deficiency of aquaporin-1“: L. S. King, M. Choi, P. C. Fernandez, J. P. Cartron, P. Agre, *N. Engl. J. Med.* **2001**, *345*, 175–179.
- [28] „Distribution of the aquaporin CHIP in secretory and resorptive epithelia and capillary endothelia“: S. Nielsen, B. L. Smith, E. I. Christensen, P. Agre, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 7275–7279.
- [29] „Aquaporin-1 water channel protein in lung: ontogeny, steroid-induced expression, and distribution in rat“: L. S. King, S. Nielsen, P. Agre, *J. Clin. Invest.* **1996**, *97*, 2183–2191.
- [30] „Decreased pulmonary vascular permeability in aquaporin-1-null humans“: L. S. King, S. Nielsen, P. Agre, R. H. Brown, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 1059–1063.
- [31] „Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule“: K. Fushimi, S. Uchida, Y. Hara, Y. Hirata, F. Marumo, S. Sasaki, *Nature* **1993**, *361*, 549–552.
- [32] „Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressin-regulated water channel in rat kidney“: S. Nielsen, S. R. Di-Giovanni, E. I. Christensen, M. A. Knepper, H. W. Harris, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 11663–11667.
- [33] „The aquaporin family of water channels in kidney“: a) S. Nielsen, P. Agre, *Kidney Int.* **1995**, *48*, 1057–1068; b) „Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane“: S. Nielsen, C. L. Chou, D. Marples, E. I. Christensen, B. K. Kishore, M. A. Knepper, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 1013–1017.
- [34] „Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine“: S. Nielsen, J. Frokiaer, D. Marples, T. H. Kwon, P. Agre, M. A. Knepper, *Physiol. Rev.* **2002**, *82*, 205–244.
- [35] „Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine“: P. M. Deen, M. A. Verdijk, N. V. Knoers, B. Wieringa, L. A. Monnens, C. H. van Os, B. A. Van Oost, *Science* **1994**, *264*, 92–95.
- [36] „Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin“: M. Yasui, A. Hazama, T. H. Kwon, S. Nielsen, W. B. Guggino, P. Agre, *Nature* **1999**, *402*, 184–187.
- [37] „Missense mutations in MIP underlie autosomal dominant ‘polymorphic’ and lamellar cataracts linked to 12q“: V. Berry, P. Francis, S. Kaushal, A. Moore, S. Bhattacharya, *Nat. Genet.* **2000**, *25*, 15–17.
- [38] „Functional impairment of lens aquaporin in two families with dominantly inherited cataracts“: P. Francis, J. J. Chung, M. Yasui, V. Berry, A. Moore, M. K. Wyatt, G. Wistow, S. S. Bhattacharya, P. Agre, *Hum. Mol. Genet.* **2000**, *9*, 2329–2334.
- [39] „Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance“: J. S. Jung, R. V. Bhat, G. M. Preston, W. B. Guggino, J. M. Baraban, P. Agre, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 13052–13056.
- [40] „Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain“: S. Nielsen, E. A. Nagelhus, M. Amiry-Moghaddam, C. Bourque, P. Agre, O. P. Ottersen, *J. Neurosci.* **1997**, *17*, 171–180.
- [41] „Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Muller cells and fibrous astrocytes“: E. A. Nagelhus, M. L. Veruki, R. Torp, F. M. Haug, J. H. Laake, S. Nielsen, P. Agre, O. P. Ottersen, *J. Neurosci.* **1998**, *18*, 2506–2519.
- [42] „Aquaporin-4 square array assembly: opposing actions of M1 and M23 isoforms“: C. S. Furman, D. A. Gorelick-Feldman, K. G. V. Davidson, T. Yasumura, J. D. Neely, P. Agre, J. E. Rash, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 13609–13614.
- [43] „Aquaporin-4 deficiency in skeletal muscle and brain of dystrophic mdx mice“: A. Frigeri, G. P. Nicchia, B. Nico, F. Quon-
- damatteo, R. Herken, L. Roncali, M. Svelto, *FASEB J.* **2001**, *15*, 90–98.
- [44] „Syntrophin-dependent expression and localization of Aquaporin-4 water channel protein“: J. D. Neely, Amiry-M. Moghaddam, O. P. Ottersen, S. C. Froehner, P. Agre, M. E. Adams, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 14108–14113.
- [45] „An alpha-syntropin-dependent pool of AQP4 in astroglial end-feet confers bidirectional water flow between blood and brain“: M. Amiry-Moghaddam, T. Otsuka, P. D. Hurn, R. J. Traystman, H. Finn-Mogens, S. C. Froehner, M. E. Adams, J. D. Neely, P. Agre, O. P. Ottersen, A. Bhardwaj, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 2106–2111.
- [46] „Delayed onset of brain edema and mislocalization of aquaporin-4 in dystrophin-null transgenic mice“: Z. Vajda, M. Pedersen, E.-M. Fuchtbauer, K. Wert, H. Stokilde-Jorgensen, E. Sulyok, T. Doczi, J. D. Neely, P. Agre, J. Frokiaer, S. Nielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 13131–13136.
- [47] „Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke“: G. T. Manley, M. Fujimura, T. Ma, N. Noshita, F. Filiz, A. W. Bollen, P. Chan, A. S. Verkman, *Nat. Med.* **2000**, *6*, 159–163.
- [48] „Molecular cloning and characterization of an aquaporin cDNA from salivary, lacrimal, and respiratory tissues“: S. Raina, G. M. Preston, W. B. Guggino, P. Agre, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 1908–1912.
- [49] „Aquaporins in complex tissues. I. Developmental patterns in respiratory and glandular tissues of rat“: L. S. King, S. Nielsen, P. Agre, *Am. J. Physiol.* **1997**, *273*, C1541–C1548.
- [50] „Defective cellular trafficking of lacrimal gland aquaporin-5 in Sjogren’s syndrome“: K. Tsubota, S. Hirai, L. S. King, P. Agre, N. Ishida, *Lancet* **2001**, *357*, 688–689.
- [51] „Abnormal distribution of aquaporin-5 water channel protein in salivary glands from Sjogren’s syndrome patients“: S. Steinfeld, E. Cogan, L. S. King, P. Agre, R. Kiss, C. Delporte, *Lab. Invest.* **2001**, *81*, 143–148.
- [52] „Selective down-regulation of aquaporin-1 in salivary glands in primary Sjogren’s syndrome“: D. Beroukas, J. Hiscock, B. J. Gannon, R. Jonsson, T. P. Gordon, S. A. Waterman, *Lab. Invest.* **2002**, *82*, 1547–1552.
- [53] „Functional requirement of aquaporin-5 in plasma membranes of sweat glands“: L. N. Nejsum, T. H. Kwon, U. B. Jensen, O. Fumagalli, J. Frokiaer, C. M. Krane, A. G. Menon, L. S. King, P. C. Agre, S. Nielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 511–516.
- [54] „Coordinated regulation of fat-specific and liver-specific glycerol channels, aquaporin adipose, and aquaporin 9“: H. Kuriyama, H. Shimomura, K. Kishida, H. Kondo, N. Furuyama, H. Nishizawa, N. Maeda, M. Matsuda, H. Nagaretani, S. Kihara, T. Nakamura, Y. Tochino, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, *Diabetes* **2002**, *51*, 2915–2921.
- [55] „Aquaglyceroporin AQP9: Solute permeation and metabolic control of expression in liver“: J. M. Carbrey, D. A. Gorelick-Feldman, D. Kozono, J. Praetorius, S. Nielsen, P. Agre, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 2945–2950.
- [56] „Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9“: Z. Liu, J. Shen, J. M. Carbrey, R. Mukhopadhyay, P. Agre, B. Rosen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 6053–6058.
- [57] „Significance of plasma lemma aquaporins for water-transport in *Arabidopsis thaliana*“: R. Kaldenhoff, K. Grote, J. J. Zhu, U. Zimmermann, *Plant J.* **1998**, *14*, 121–128.
- [58] „The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions“: N. Uehlein, C. Lovisolo, F. Siefritz, R. Kaldenhoff, *Nature* **2003**, *425*, 734–737.
- [59] „Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins“: C. Tournaire-Roux, M. Sutka, H. Javot, E. Gout, P. Gerbeau, D. T. Luu, R. Bligny, C. Maurel, *Nature* **2003**, *425*, 393–397.

- [60] „Effect of expressing the water channel aquaporin-1 on the CO₂ permeability of Xenopus oocytes“: N. L. Nakhoul, B. A. Davis, M. F. Romero, W. F. Boron, *Am. J. Physiol.* **1998**, 274, C297–298.
- [61] „Transport of water and glycerol in aquaporin 3 is gated by H(+)“: T. Zeuthen, D. A. Klaerke, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 21631–21636.
- [62] „Functional expression and characterization of an archaeal aquaporin: AqpM from *Methanothermobacter marburgensis*“: D. Kozono, X. Ding, I. Iwasaki, X. Meng, Y. Kamagata, P. Agre, Y. Kitagawa, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 10649–10656.
-
- [63] „Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts“: S. Hohmann, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2002**, 66, 300–372.
- [64] S. Ramón y Cajal, *Advice to a Young Investigator* (1897), übersetzt von N. Swanson, L. W. Swanson, Cambridge, MIT Press, **1999**.
- [65] „Aquaporin water channels – from atomic structure to clinical medicine“: P. Agre, L. S. King, M. Yasui, W. B. Guggino, O. P. Ottersen, Y. Fujiyoshi, A. Engel, S. Nielsen, *J. Physiol.* **2002**, 542, 3–16.