

# NPA motif在水通道蛋白AQP1 表达和转水功能中的重要性

姜勇 麻彤辉\*

(东北师范大学膜通道实验室, 长春 130024. \* 联系人, E-mail: math108@nenu.edu.cn)

**摘要** 水通道蛋白(AQP)序列中的两个天冬酰胺-脯氨酸-丙氨酸序列(NPA motif)是水通道蛋白家族中高度保守的特征性序列, 其晶体结构研究显示, 两个NPA motifs 位于通道中心的狭窄部位, 直接参与水分子的结合和选择性通过. 为了进一步研究两个 NPA motifs 在水通道蛋白结构、功能和生源学(biogenesis)方面的重要性, 通过点突变方法分别获得单独缺失 NPA1 或 NPA2 motif 以及同时缺失两个 NPA motifs 的 3 种水通道 AQP1 基因突变型. 将 3 种 AQP1 突变 cDNA 分别亚克隆入真核表达载体 pcDNA3.1, 建立稳定转染 3 种 AQP1 基因突变型的 CHO 细胞系. AQP1 免疫荧光分析显示, 3 种 AQP1 突变蛋白均能正常表达并定位于质膜, 显示 AQP1 蛋白质表达和细胞内加工过程未受 NPA motifs 缺失的影响. 分别对表达 3 种 AQP1 突变蛋白的 CHO 细胞进行质膜水通透性功能分析, 并与表达野生型 AQP1 的 CHO 细胞进行比较, 结果显示, 缺失 NPA1 或 NPA2 引起 AQP1 转水功能下降 49.6%和 46.7%, 而同时缺失两个 NPA motifs 的 AQP1 转水功能与野生型 AQP1 相似. 上述结果显示, 水通道 AQP1 中的 NPA motifs 在 AQP1 转水功能中发挥重要作用, 但对于 AQP1 蛋白的表达、细胞内加工和通道基本结构的形成并不起关键作用.

**关键词** 水通道蛋白 NPA motif 突变 水通透性 生源学(biogenesis)

水通道蛋白(aquaporin, AQP)是一类存在于细胞膜上的水通透性蛋白, 从细菌等原核生物到人体等哺乳动物都广泛存在. 从Preston等人<sup>[1]</sup>发现第一个水通道蛋白AQP1 以来, 研究人员已经发现和鉴定了属于AQP家族的 13 个哺乳动物水通道(AQP0~12), 以及数以百计的其他动植物和微生物水通道蛋白基因. 水通道蛋白序列中有两个高度保守的NPA motifs, 是该蛋白家族成员所共同具有的特征序列, 其在水通道蛋白的结构和功能中具有重要作用.

对AQP1 结构的研究表明, AQP1 是以四聚体形式存在于细胞膜表面的<sup>[2]</sup>, 每个单体分别形成水分子穿越的孔道, 独立行使功能<sup>[3,4]</sup>. AQP1 分子的一级结构是一个单肽链, 含有 6 个跨膜区, 氨基酸链在膜两侧形成 5 个环形结构(loopA~E). B和E环显著疏水. 蛋白分子氨基、羧基末端、B及D环均在胞内, A, C, E环定位于胞外. 整个分子由 2 个序列上相似的同向重复部分组成, 在膜上呈 180°中心对称排列. B和E环中各含一个天冬酰胺-脯氨酸-丙氨酸(Asn-Pro-Ala, NPA)

重复串联序列(76~78, 192~194)<sup>[5~10]</sup>. 在水分子通过 AQP1 的原子模型中, 包含NPA的B环和E环深入到 AQP1 蛋白分子内部形成短的 $\alpha$ -螺旋,  $\alpha$ -螺旋的N末端朝向水分子的通路, 共同形成一个定向局部静电场, 使得通过的水分子中氧原子定向朝向NPA motif 中的两个Asn残基, 以便形成氢键. 但只有一个水分子和两个Asn残基之间通过氢键联系, 结果水分子排成单排, 分别形成和断裂 2 次氢键, 同时转换方向顺次通过水通道的内部核心区. 这种旋转方向的转换阻止了通道内部形成连续的水合质子分子网, 加上通道内部带正电荷的氨基酸残基排斥带正电荷的 $H_3O^+$ , 从而阻断了质子通过水通道<sup>[11~13]</sup>.

为了进一步揭示两个 NPA motifs 在水通道蛋白结构、功能和生源学(biogenesis)方面的重要性, 本研究通过点突变方法分别制备缺失 NPA1 或 NPA2 motif 以及同时缺失两个 NPA motifs 的 3 种水通道 AQP1 基因突变型, 在稳定转染的真核细胞上对 NPA motifs 在 AQP1 蛋白质表达和转水功能中的重要性进行了研究.

2006-12-20 收稿, 2007-01-25 接受

国家杰出青年科学基金(批准号: 30325011)、国家自然科学基金(批准号: 30470405 和 30670477)、吉林省杰出青年科学基金(批准号: 20030112)和教育部青年骨干教师资助计划资助项目

## 1 材料与方法

( ) 表达质粒的构建. 含有对氯离子高度敏感的 EYFP 突变体, 即 720 bp EYFP-H148Q-V163S DNA 片段的哺乳动物表达质粒 pcDNA3.1 Hygro-EYFP-H148Q-V163S (Hygromycin-resistant)由美国加州大学旧金山分校 Peter Haggie 博士惠赠.

AQP1 $\Delta$ NPA 突变是以大鼠野生型 AQP1 重组质粒 pcDNA3.1-rAQP1wt(本室早期构建)为模板, 通过 PCR 的方法, 分别扩增出 NPA 前后的片段, 并分别连接到哺乳动物表达载体 pcDNA3.1MycHisA (G418-resistant, Invitrogen)上. 共设计了 6 条引物: (1) 5'-CCC-AAgCTTATggCCAgCgAgTTCAAgAAg-3' (正向); (2) 5'-ggggTACCAGgTgAgCACCAGTgTgACC-3' (反向); (3) 5'-ggggTACCAGTggggCTTCTgCTCAGCTgTC-3' (正向); (4) 5'-CgggATCCCACAgCCAgTgTAgTCAATggC-3' (反向); (5) 5'-CgggATCCggTCATTTggCTCTgCTgTgCTC-3' (正向); (6) 5'-gATCTAgATTATTTgggCTTCATCTCCACCCTg-3' (反向).

用引物 1 和 2 扩增出 NPA1 之前的 225 bp 片段, 再用 *Hind* /*Kpn* 消化并连接到 *Hind* /*Kpn* 预消化的哺乳动物表达载体 pcDNA3.1MycHisA (G418-resistant, Invitrogen)上, 构成表达质粒 pcDNA3.1-rAQP1 NPA1 上游序列. 用引物 3 和 6 扩增出 NPA1 之后的 585 bp 片段, 用 *Kpn* /*Xba* 消化并连到由 *Kpn* /*Xba* 预消化的表达质粒 pcDNA3.1-rAQP1 NPA1 上游序列, 构成表达质粒 pcDNA3.1-rAQP1 $\Delta$ NPA1. 用引物 1 和 4 扩增出 NPA2 之前的 573 bp 片段, 用 *Hind* /*Bam*H 消化并连接到 *Hind* /*Bam*H 预消化的哺乳动物表达载体 pcDNA3.1MycHisA (G418-resistant, Invitrogen)上, 构成表达质粒 pcDNA3.1-rAQP1 NPA2 上游序列. 用引物 5 和 6 扩增出 NPA2 之后的 237 bp 片段, 用 *Bam*H /*Xba* 消化并连到由 *Bam*H /*Xba* 预消化的表达质粒 pcDNA3.1-rAQP1 NPA2 上游序列, 构成表达质粒 pcDNA3.1-rAQP1 $\Delta$ NPA2. 用引物 1 和 4 以表达质粒 pcDNA3.1-rAQP1 $\Delta$ NPA1 为模板 PCR 扩增出 NPA2 之前的 573 bp 片段, 用 *Hind* /*Bam*H 消化并连接到 *Hind* /*Bam*H 预消化的表达质粒 pcDNA3.1-rAQP1 $\Delta$ NPA2 上, 构成表达质粒 pcDNA3.1-rAQP1 $\Delta$ NPA1 和 2.

所有 PCR 反应均用 Vent DNA polymerase (New England Biolabs)进行. 对所有的 AQP1 突变表达质粒进行 DNA 序列测定, 证实其准确性.

( ) 细胞培养. 哺乳动物细胞为中国仓鼠卵巢细胞(Chinese hamster ovary cell, CHO)用含 10%的胎牛血清的 F12 Ham's 完全培养基, 添加 100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素, 于 37 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养.

( ) 稳定转染. CHO 细胞稳定转染按文献[14]方法进行, 略有改动. 表达质粒 pcDNA3.1 Hygro-EYFP-H148Q-V163S 经脂质体 Lipofectamin 2000 (Invitrogen)转染 CHO 细胞, 用含 500  $\mu$ g/mL Hygromycin (Roche)选择性培养基进行筛选, 挑取表达绿色荧光的单克隆细胞(CHO-EYFP-H148Q-V163S). 在荧光显微镜下观察各单克隆细胞绿色荧光表达情况, 选择绿色荧光比率高的细胞克隆在 96 孔板上进行有限稀释, 纯化出稳定高表达绿色荧光的细胞.

表达质粒 pcDNA3.1-rAQP1 $\Delta$ NPA1, pcDNA3.1-rAQP1 $\Delta$ NPA2, pcDNA3.1-rAQP1 $\Delta$ NPA1 和 2 及 pcDNA3.1-rAQP1wt 分别经脂质体 Lipofectamin 2000 (Invitrogen)转染 CHO-EYFP-H148Q-V163S 细胞, 用含 500  $\mu$ g/mL G418 (Roche)选择性培养基进行筛选, 分别挑取表达 rAQP1 $\Delta$ NPA1, rAQP1 $\Delta$ NPA2, rAQP1 $\Delta$ NPA1 和 2 以及 rAQP1wt 的单克隆细胞(CHO-rAQP1 $\Delta$ NPA1/EYFP-H148Q-V163S, CHO-rAQP1 $\Delta$ NPA2/EYFP-H148Q-V163S, CHO-rAQP1 $\Delta$ NPA1 和 2/EYFP-H148Q-V163S 及 CHO-rAQP1 wt/EYFP-H148Q-V163S).

( ) 免疫荧光. 将 CHO 接种培养到载玻片上, 培养 24 h 后, 用 4%多聚甲醛溶液室温固定 15 min. PBS 溶液洗细胞 1 次, 用含 0.1%(体积比)Triton X-100 PBS 作用 10 min. PBS 溶液洗细胞 1 次, 用含 2%牛血清白蛋白(Sigma)的 PBS 封闭 1 h. 分别加入兔抗大鼠 AQP1 多克隆抗体(Chemicon, AB3065, 1:1000)于 4 过夜. PBS 溶液洗细胞 3 次, 每次 5 min, 以 Cy3 标记的羊抗兔 IgG 二抗(Sigma, 1:500)室温孵育 30 min. PBS 溶液洗细胞 3 次, 每次 5 min, 在 OLYMPUS BX60 荧光显微镜下观察并照相. 在共定位实验中, 同时加入 AQP1 单克隆抗体(Santa Cruz, sc-25287, 1:100)和兔抗内质网分子伴侣葡萄糖调节蛋白 GRP94 多克隆抗体(Boster, BA1628, 1:200)于 4 过夜. PBS 溶液洗细胞后, 同时加入 Cy3 标记的羊抗鼠 IgG 二抗(Sigma, 1:500)和 FITC 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(Sigma, 1:500)室温孵育 30 min. PBS 溶液洗细胞后, 荧光显微镜下照相并作覆盖图(overlay).

( ) 质膜 AQP1 相对表达量分析. 应用 Imagine J

定量分析软件对稳定表达3种AQP1基因突变型和野生型AQP1的CHO细胞系免疫荧光图像进行分析。在每种细胞系免疫荧光图像中,分别随机选取50个相似位置的 $2\mu\text{m} \times 2\mu\text{m}$ 细胞质膜区域,读取相对应的灰度值。3种AQP1突变蛋白灰度值与野生型AQP1蛋白灰度值的比值反映3种AQP1突变蛋白在质膜上的相对表达量。通过质膜荧光灰度分析选出突变型AQP1蛋白表达水平与野生型相似的克隆进行质膜水通透性分析。

( ) 质膜水通透性测定。质膜水通透性测定方法参考文献[15~17]。将CHO-rAQP1 $\Delta$ NPA1/EYFP-H148Q-V163S, CHO-rAQP1 $\Delta$ NPA2/EYFP-H148Q-V163S, CHO-rAQP1 $\Delta$ NPA1和2/EYFP-H148Q-V163S, CHO-rAQP1wt/EYFP-H148Q-V163S共4种细胞按每孔20000个细胞的密度铺于黑壁透明底的96孔培养板(Corning-Costar 3904),培养液为F12 Ham's完全培养基(含有10%胎牛血清、青霉素、链霉素终浓度100 U/mL),在CO<sub>2</sub>孵箱中(37℃, 5% CO<sub>2</sub>)培养24 h后形成单层后, PBS溶液洗细胞2次(200  $\mu\text{L}$ /次),最后一次每孔留100  $\mu\text{L}$  PBS溶液。在FluoStar Optima (BMG Biotech) 荧光仪上测定, 激发光和发射光滤光片波长分别为HQ500/20X (500 $\pm$ 10 nm)和HQ535/30M (535 $\pm$ 15 nm)。以5个数据点/s(0.2 s/点)的速度连续测定30 s, 其中前2 s为基线, 2 s后向细胞培养孔中快速注入100  $\mu\text{L}$ 超纯水(时间<100 ms)使细胞外液渗透压降低50%, 继续测定28 s。由渗透压驱动的细胞外H<sub>2</sub>O通过AQP1水通道进入细胞, 稀释细胞质中的[Cl<sup>-</sup>], 降低了Cl<sup>-</sup>对EYFP-H148Q-V163S荧光的淬灭作用, 细胞荧光值随时间变化而增加, 质膜水通透性用从注入超纯水到达到最大荧光值所需时间的倒数(1/ $\tau$ )表示(参照文献[17])。较大的1/ $\tau$ 值表示较高的水通透性。表达3种AQP1突变蛋白的CHO细胞质膜水通透性与表达野生型AQP1的CHO细胞质膜水通透性的比值显示3种AQP1突变蛋白的相对水通透性。

## 2 结果

### 2.1 点突变方法制备删除NPA motif的AQP1基因突变型

图1示NPA motifs在水通道AQP1拓扑结构中的位置、 $\Delta$ NPA突变的设计和AQP1基因突变型的真核表达质粒图。对AQP1 $\Delta$ NPA1, AQP1 $\Delta$ NPA2, AQP1 $\Delta$ NPA1和2三种AQP1基因突变型DNA序列测定分析显示(图

2), AQP1中NPA motif分别被成功删除。

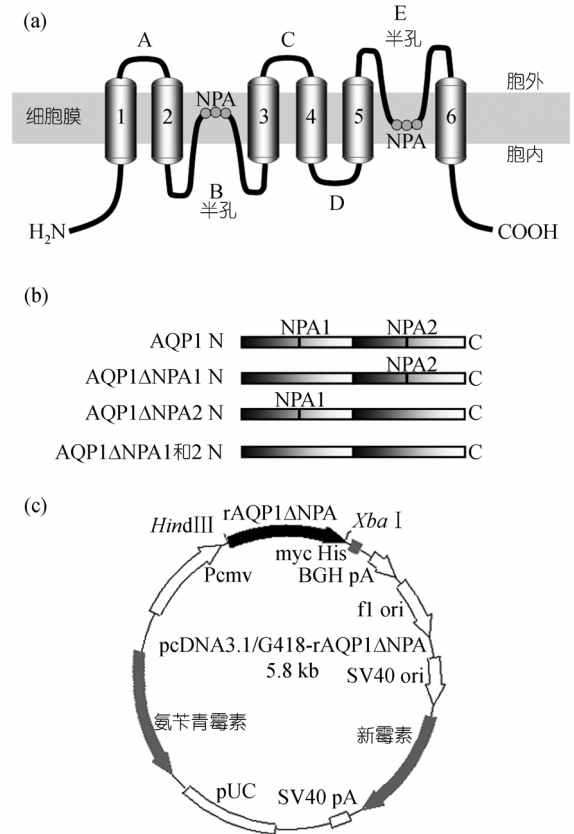


图1 NPA motifs的删除策略

(a) AQP1水通道的拓扑结构模式图。两个保守的NPA motifs分别位于B和E环。(b) 删除NPA motif的AQP1突变设计。(c) AQP1基因突变型的真核表达质粒图

### 2.2 NPA motif缺失不影响AQP1蛋白表达和细胞内加工

将表达质粒pcDNA3.1-rAQP1 $\Delta$ NPA1, pcDNA3.1-rAQP1 $\Delta$ NPA2, pcDNA3.1-rAQP1 $\Delta$ NPA1和2及pcDNA3.1-rAQP1wt分别转染CHO-EYFP-H148Q-V163S细胞(细胞质中稳定表达对氯离子高度敏感的荧光蛋白突变体EYFP/H148Q/V163S), 经抗生素筛选及有限稀释纯化后, 分别获得了24个单克隆。对其进行免疫荧光分析, 结果显示, 3种突变AQP1蛋白在CHO细胞的表达和定位与野生型AQP1极为相似(图3(a)~(e))。为了进一步证实突变AQP1蛋白在质膜的表达, 我们对各细胞系进行了AQP1/ER双标记, 结果显示, 3种突变AQP1蛋白在质膜的定位情况相似(图3(f), 示AQP1 $\Delta$ NPA1和2共定位结果)。质膜

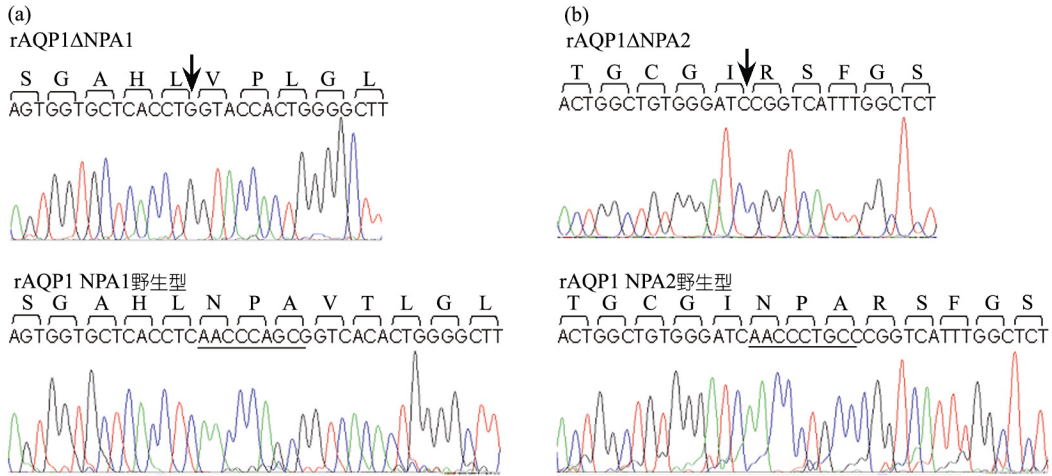


图 2 AQP1ΔNPA 突变的 DNA 序列分析

图示 3 种 AQP1 基因突变型中 ΔNPA1 和 ΔNPA2 的 DNA 序列测定

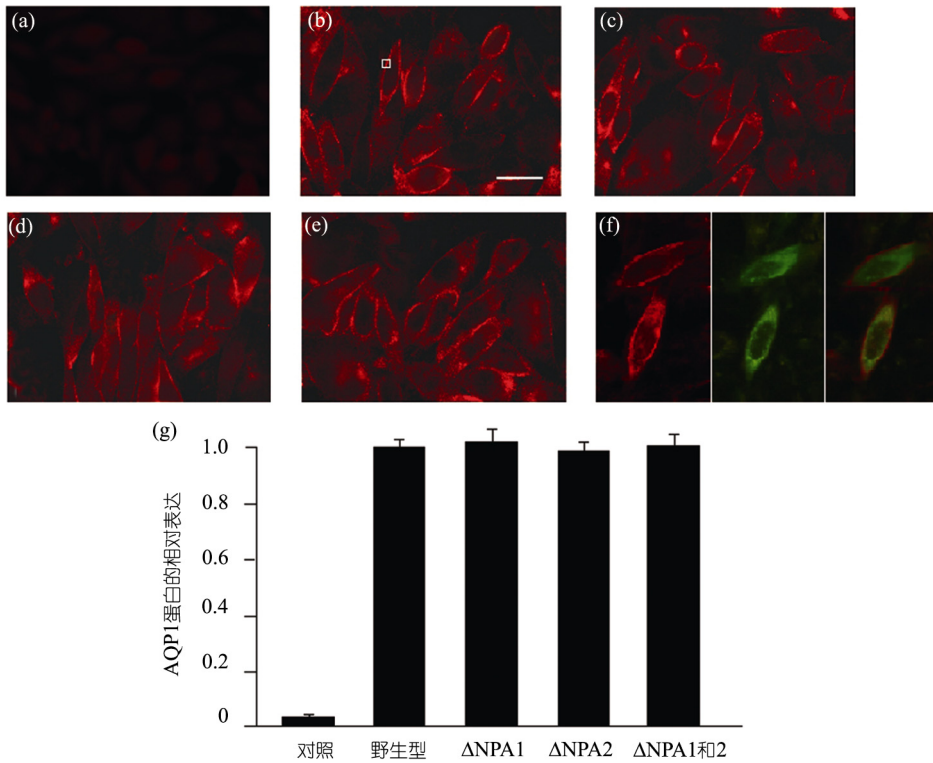


图 3 AQP1 突变蛋白和 AQP1 野生型蛋白表达分析

(a)~(e) 突变型和野生型 AQP1 的免疫荧光分析。(a) 稳定转染 EYFP-H148Q-V163S 的 CHO 对照细胞；(b) 野生型 AQP1；(c) AQP1ΔNPA1；(d) AQP1ΔNPA2；(e) AQP1ΔNPA1 和 2。(f) AQP1ΔNPA1 和 2 的质膜表达。(g) 质膜 AQP1 蛋白相对表达量分析 ( $n = 50$ , 平均值  $\pm$  SE),  $t$  检验无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。在 (f) 中, AQP1 染色(左), GRP94 内质网染色(中), 两种染色叠加(右)。AQP1ΔNPA1 和 AQP1ΔNPA2 与 AQP1ΔNPA1 和 2 结果相似, 数据未显示。随机选取  $2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$  细胞质膜区域如 (b) 所示。标尺示  $10 \mu\text{m}$

荧光灰度分析显示, 突变型 AQP1 蛋白表达水平与野生型相似(图 3(g)). 结果表明, AQP1 蛋白质表达和细胞内加工过程未受 NPA motifs 缺失的影响.

### 2.3 AQP1 突变型和野生型的质膜水通透性功能分析

图 4 所示 3 种稳定表达 AQP1 基因突变型和 AQP1 野生型 CHO 细胞的质膜水通透性功能分析. 结果显示, 缺失 NPA1 或 NPA2 分别使 AQP1 转水功能下降 49.6% 和 46.7%, 显著影响了 AQP1 的转水效率. 出乎意料的是, 同时缺失两个 NPA motifs 的 AQP1 转水功能与野生型 AQP1 相似, 表明通道内部形成了新的高效水分子通路.

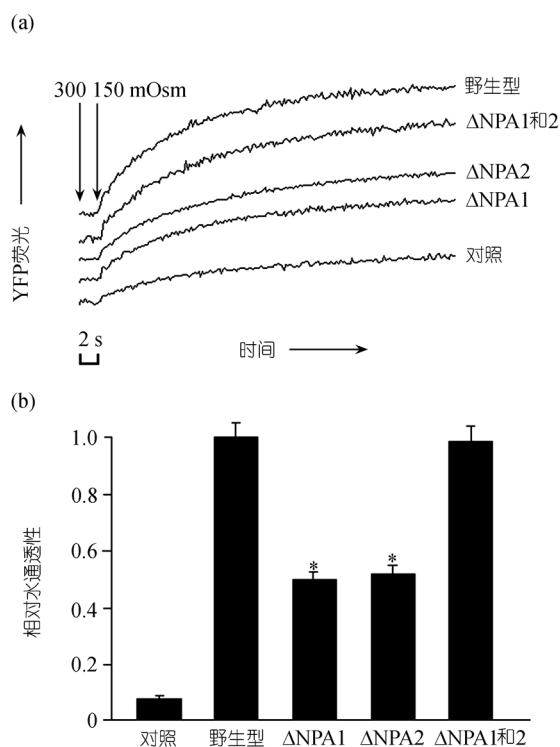


图 4 AQP1 突变型和野生型的质膜水通透性功能分析

(a) 渗透压诱发的细胞荧光动力学曲线. (b) 质膜相对水通透性 ( $n = 6$ , 平均值 $\pm$ SE). \* 示差异显著 ( $P < 0.001$ ). AQP1 $\Delta$ NPA1 和 2 与野生型比较, 无显著性差异 ( $P > 0.05$ )

## 3 讨论

水通道蛋白选择性地高效通透水分子, 而阻止质子等其他离子通过的机理已经通过晶体结构研究得到阐明. 在沙漏模型中, 由于通道中央核心处狭窄, 水分子只能排成单行通过<sup>[18]</sup>. B和E环中包括NPA motif在内的很多氨基酸残基是保守的, 它们共同形成了通道内部的局部静电场, 这使得水分子在通过通道

时, 进行旋转式双极运动, 通过上半部时的旋转方向与通过下半部时的旋转方向相反<sup>[11,19]</sup>. 水分子的这种偶极转动对于水分子的选择转运很重要<sup>[20]</sup>. B环中的His74 和E环中的Arg195 是带正电荷的氨基酸残基可以阻止离子通过<sup>[21]</sup>. Sui等人<sup>[22]</sup>研究发现, 在水通道沙漏模型的核心结构中有 3 个亲水区域(Ala73, His74 区域, NPA motif中Asn76, Asn192 区域和His180, Gly190 区域), 可以与 4 个水分子相互作用, 而其余绝大部分区域则由大量疏水残基排列形成疏水环境, 提示通道核心结构中的疏水环境和极少量的离子结合位点有助于水分子快速顺畅地通过通道.

本研究发现, AQP1 $\Delta$ NPA1 和AQP1 $\Delta$ NPA2 转水功能显著下降, 说明水通道中核心结构有了一定程度的破坏, 使水分子通过通道的速度减慢, 但转水功能并未完全丧失. AQP1 $\Delta$ NPA1 和 2 转水功能与野生型相似, 说明水通道核心结构中建立了新的通路, 使水分子能够正常通过. 在本研究中NPA motifs并非 AQP1 转水功能所必须, 说明AQP1 中的其余保守氨基酸残基对于通道内部的核心结构也起重要作用, 提示水通道核心结构可能由多个保守位点共同组成. Grubmuller等人<sup>[20]</sup>发现, AQP1 的结构中有 2 个区域对于其功能很重要: 一个是NPA motif, 选择决定水分子通过; 另一个是Ar/R(芳香族/精氨酸区域), 阻止质子通过. Yoshinori等人<sup>[19]</sup>发现, 在NPA motif和Ar/R(芳香族/精氨酸区域)中, Ar/R是AQP1 核心中最狭窄的区域. Kong等人<sup>[18]</sup>发现, Phe24, Phe56, His180 也参与了AQP1 中核心结构的形成. 而且AQP1 的核心结构尺寸大小是变化的、动态的, 通过AQP1 的水流经常因核心结构尺寸缩小而被中断, 这样可以阻止质子转运, 而且水分子通过AQP1 中核心结构的路线是弯曲的.

另外, Beitz等人<sup>[23]</sup>近期在一项研究中发现, 将AQP1 的Ar/R(芳香族/精氨酸区域)的特定氨基酸突变后, 其可以转运尿素、甘油和质子等. 在下一步工作中, 我们将对NPA motifs去除后AQP1 的通道选择性变化, 如对于质子和其他离子以及中性小分子是否具有通透性进行深入研究.

## 参 考 文 献

- 1 Preston G M, Carroll T P, Guggino W B, et al. Appearance of water channels in *Xenopus oocytes* expressing red cell CHIP28 protein. *Science*, 1992, 256: 385—387[DOI]
- 2 Verbavatz J M, Brown D, Sabolic L, et al. Tetrameric assembly of

- CHIP28 water channels in liposomes and cell membranes: A freeze-fracture study. *J Cell Biol*, 1993, 123: 605—618[DOI]
- 3 Preston G M, Jung J S, Guggino W B, et al. The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel. *J Biol Chem*, 1993, 268: 17—20
- 4 Shi L B, Skach W R, Verkman A S. Functional independence of monomeric CHIP28 water channels revealed by expression of wild-type mutant heterodimers. *J Biol Chem*, 1994, 269: 10417—10422
- 5 Heymann J B, Agre P, Engel A. Progress on the structure and function of aquaporin 1. *J Struct Biol*, 1998, 121(2): 191—206[DOI]
- 6 Heymann J B, Engel A. Structural clues in the sequences of the aquaporins. *J Mol Biol*, 2000, 295(4): 1039—1053[DOI]
- 7 Agre P, King L S, Yasui M, et al. Aquaporin water channels—from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol*, 2002, 542: 3—16[DOI]
- 8 de Groot B L, Heymann J B, Engel A. The fold of human aquaporin 1. *J Mol Biol*, 2000, 300(4): 987—994[DOI]
- 9 Verkman A S, Alok K M. Structure and function of aquaporin water channels. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000, 278: 13—28
- 10 de Groot B L, Engel A, Grubmuller H. The structure of the aquaporin-1 water channel: A comparison between cryoelectron microscopy and X-ray crystallography. *J Mol Biol*, 2003, 325(3): 485—493[DOI]
- 11 Tajkhorshid E, Nollert P, Jensen M O, et al. Control of the selectivity of the aquaporin water channel family by global orientational tuning. *Science*, 2002, 296: 525—530[DOI]
- 12 Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, et al. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature*, 2000, 407: 599—605[DOI]
- 13 Zeuthen T. How water molecules pass through aquaporins. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26: 77—79[DOI]
- 14 Ma T, Antonio F, Tsai S, et al. Localization and functional analysis of CHIP28k water channels in stably transfected Chinese Hamster Ovary cells. *J Biol Chem*, 1993, 268 (30): 756—764
- 15 Jin S, Liu Y, Xu L, et al. Cloning and characterization of a porcine aquaporin 1 water channel expressed extensively in gastrointestinal system. *World J Gastroenterol*, 2006, 12: 1092—1097
- 16 李永明, 冯学超, 杨红, 等. 水通道蛋白 AQP1 的表达促进 SMMC-7221 人肝癌细胞的迁移. *科学通报*, 2006, 51(17): 2024—2029
- 17 Solenov E, Watanabe H, Manley G T, et al. Seven-fold-reduced osmotic water permeability in primary astrocyte cultures from AQP4 deficient mice, measured by a fluorescence quenching method. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 286: C426—C434[DOI]
- 18 Kong Y, Ma J. Dynamic mechanisms of the membrane water channel aquaporin-1(AQP1). *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 4345—4349
- 19 Yoshinori F, Kaoru M, de Groot B L, et al. Structure and function of water channels. *Curr Opin Struct Biol*, 2002, 12: 509—515[DOI]
- 20 de Groot B L, Grubmuller H. Water permeation across biological membranes: Mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. *Science*, 2001, 294: 2353—2357[DOI]
- 21 Engel A, Fujiyoshi Y, Agre P. The importance of aquaporin water channel protein structures. *EMBO J*, 2000, 19: 800—806[DOI]
- 22 Sui H, Han B G, Lee J K, et al. Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature*, 2001, 414: 872—878[DOI]
- 23 Beitz E, Wu B, Lars M, et al. Point mutations in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycine, ammonia, and protons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 269—274[DOI]