

Revisão: transportadores de água

L. CHEIDDE, N. SCHOR

Disciplina de Nefrologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP.

UNITERMOS: Fisiologia Renal. Transporte de água. Canais de água. Aquaporinas. Diabetes Insipidus Nefrogênico.

KEY WORDS: Renal Physiology. Water Transport. Water Channels. Nephrogenic Diabetes Insipidus. Aquaporins.

MECANISMOS DE TRANSPORTE DE ÁGUA

A absorção da maior parte dos eletrólitos e água filtrada é uma função primária do néfron e sua regulação é essencial para a manutenção do balanço de fluidos corpóreos. O processo de absorção do volume envolve o movimento de água através da camada de células epiteliais de várias regiões do néfron em resposta à diferença de osmolalidade através das membranas celulares individuais e/ou dos complexos juncionais e espaços paracelulares que separam as células adjacentes. No entanto, as características relacionadas ao movimento de água, acoplado ou não, ao transporte de soluto varia consideravelmente dependendo do segmento do néfron. Isso pode ser dividido convenientemente em três classes de epitélio: os altamente permeáveis à água, os relativamente impermeáveis à água e a classe de epitélio híbrido, cuja permeabilidade à água é regulado hormonalmente, podendo ser de alta ou de baixa permeabilidade¹.

O túbulo proximal (TP) do mamífero é um bom exemplo da primeira classe de epitélio, no qual a elevada permeabilidade à água promove um rápido equilíbrio entre os dois lados do epitélio, prevenindo qualquer diferença significativa de osmolalidade transepitelial. No entanto, para diluir a urina e estabelecer um meio hiperosmótico no interstício medular, os rins dos mamíferos necessitam de regiões de baixa permeabilidade à água como a porção ascendente da Alça de Henle (AH) onde ocorre reabsorção de sal independentemente de água.

No túbulo distal (TD) e ducto coletor (DC) a permeabilidade do epitélio à água pode ser regulada, não sendo tão impermeável quanto a AH, nem tão permeável quanto o TP. Em estados de alta permeabilidade desse epitélio, o fluido tubular equilibra-se com o interstício resultando na concentração da

urina na região medular. Por outro lado, em estados de baixa permeabilidade à água, o TD e o DC, agem como um prolongamento da AH promovendo a diluição da urina pela absorção do soluto na ausência de absorção de água.

O desenvolvimento de quase um século de idéias levou à formulação de cinco conceitos fundamentais que guiaram os pensamentos nos últimos 30 anos a respeito do movimento da água através das membranas celulares¹:

a) vias especializadas para passagem de água e outros solutos hidrofílicos, em particular a idéia de canais ou poros nas membranas biológicas;

b) formulação de explicações mecânicas da osmose em termos de gradientes de pressão através desses poros;

c) demonstração de uma rede de transporte de água na ausência de qualquer força propulsora ou oposta a um gradiente da água;

d) demonstração de que uma carga estagnada de solutos poderia ter efeitos dramáticos na mensuração dos parâmetros do transporte da membrana;

e) atuais conhecimentos da organização de um epitélio com a possibilidade de transporte transcelular e paracelular de volume.

O potencial que direciona das forças para a reabsorção de água no TP são as mesmas que movimentam a água através da membrana do endotélio capilar: resultante das diferenças da pressão hidráulica e da pressão osmótica transepiteliais. Ao contrário dos capilares, existe somente uma pequena diferença da pressão hidráulica através do epitélio do TP, menos de 5 mmHg, sendo portanto, a diferença de pressão osmótica transepitelial a principal força reguladora para a reabsorção de fluido no TP.¹

No TP, o transporte de água do lúmen tubular para o capilar peritubular ocorre passivamente em consequência da reabsorção ativa de soluto, predominantemente à reabsorção de NaCl. A absorção de pequenas quantidades de solutos leva à diluição do fluido tubular, tornando-o hipotônico. Ao mesmo tempo, a baixa permeabilidade do capilar peritubular resulta no desenvolvimento de um interstício hipertônico, principalmente em consequência da reabsorção preferencial de solutos como a glicose,

aminoácidos e bicarbonato. Essa hipertonicidade intersticial, associada à hipotonicidade do fluido tubular e à alta permeabilidade do TP à água, direcionam seu fluxo, tornando o fluido tubular praticamente isotônico. Além disso, os solutos que são preferencialmente absorvidos parecem ter coeficiente de reflexão maior que do NaCl, o que criaria maior diferença de osmolalidade entre o interstício e o fluido tubular.

A correlação entre o movimento de fluido e as dimensões dos espaços intercelulares laterais estabelece que o fluido reabsorvido movimentar-se do lúmen tubular para o capilar peritubular através dos espaços intercelulares laterais, seja via complexos juncionais, constituindo um transporte paracelular, ou via membrana celular basolateral, constituindo um transporte transcelular. Sugere-se que ao menos 50% do fluido mova-se através das células, porém até hoje não existe nenhum consenso em relação ao transporte paracelular, uma vez que as estimativas variam de menos de 2% até mais de 50%¹. A via paracelular é conhecida pela sua maior taxa de difusão passiva de íons enquanto que a via transcelular demonstra reduzida permeabilidade desses íons. O movimento de água via paracelular se dá pelo transporte de soluto por convecção (*solvent drag*); como a membrana plasmática possui baixa permeabilidade ao fluxo de solutos, o transporte de água transepitelial por convecção é muito menor. No entanto, o transporte de água no TP ocorre via transcelular na forma de água livre através de canais de água denominados de aquaporinas¹.

DESCOBERTA DOS CANAIS DE ÁGUA

Em 1987, Finkelstein² identificou uma nova proteína da membrana dos glóbulos vermelhos e nas células do túbulo contornado proximal que apresentava uma incomum insolubilidade à detergentes. Essa proteína consistia de um homotetrâmero que residia primariamente entre os folhetos da membrana e foi denominada de CHIP (Channel-Forming Integral Protein).

Em 1991, Preston *et al.*³ e Preston e Agre⁴ isolaram e clonaram o CHIP da célula precursora do eritrócito no fígado fetal e demonstraram sua função após isolar seu DNA complementar (cDNA). A expressão do RNA complementar (cRNA) em oócitos de *Xenopus* conferiu a célula um aumento aproximado de 20 vezes no coeficiente de permeabilidade à água (Pf) com inibição reversível ao mercúrio e à baixa ativação de energia.

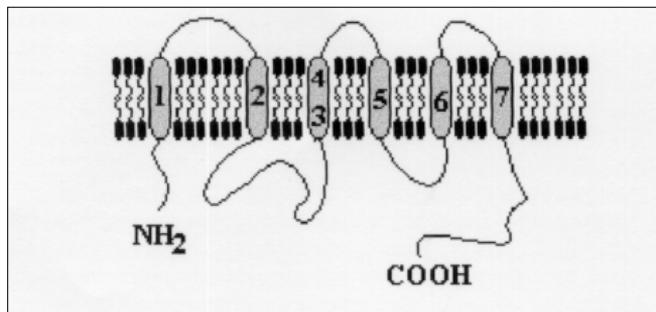


Fig. 1 - Proposta para a topologia transmembrana do CHIP 28. Os números representam os domínios localizados na camada bilipídica da membrana. (Adaptado de Verkman^{6a})

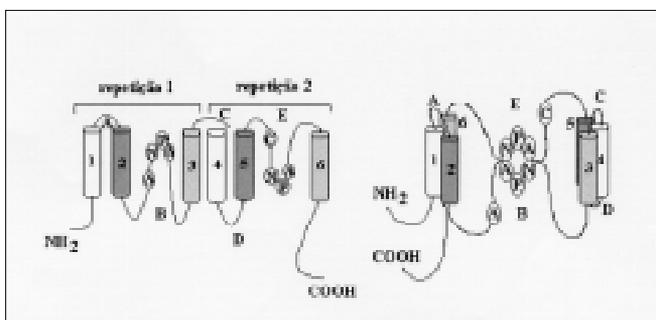


Fig. 2 - Modelo de Houghlass para a estrutura da aquaporina. Apresenta 6 domínios na camada bilipídica da membrana plasmática com NH₂ e COOH terminal intracelular. Os locais de repetição interna de proteínas homólogas são idênticos em aproximadamente 20% das moléculas e os domínios mais conservados, as alças B e E estão esquematizados na figura. (Adaptado Nielsen^{9a}).

CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS E MOLECULARES DOS CANAIS DE ÁGUA

O primeiro canal de água descoberto foi o CHIP28, denominado posteriormente de aquaporina 1 (AQP1). Consiste de uma proteína altamente hidrofóbica cujo peso molecular varia de 28 kDa na forma não-glicosilada e 40 a 50 kDa na forma glicosilada. Possui seis domínios localizados na camada bilipídica da membrana com NH₂- intracelular e COOH- terminal^{4,5,6} (Fig.1). Sua estrutura é assimétrica tridimensional com uma superfície plana externa e uma protuberância citoplasmática dominante⁷. Repetições internas foram previamente reconhecidas em proteínas homólogas nas quais a estrutura molecular do NH₂-intracelular e do COOH- terminal são idênticos em aproximadamente 20% das moléculas, presumivelmente devido à duplicação gênica^{8,9}. Os domínios mais conservados são duas conexões hidrofóbicas: alça B (face citoplasmática) e alça E (face extracelular), cada uma contendo uma estrutura de Asn-Pro-Ala (NPA) (Fig.2). Essa proteína forma

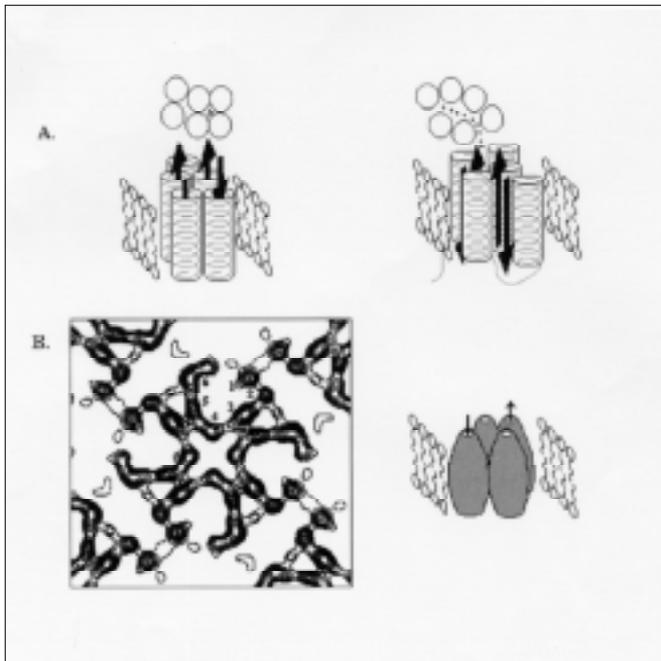


Fig. 3 - Proposta para a via de transporte da água. (Adaptado de Nielsen^{9a}).

um tetrâmero¹⁰ com quatro subunidades idênticas de polipeptídeos, com um grande glycan atado em somente uma subunidade (Fig.3). Foi demonstrado que a sensibilidade ao mercúrio ocorre na cisteína 189, adjacente ao segundo NPA¹¹.

A permeabilidade à água é determinada pelas subunidades individuais^{5,6,12}. As Aquaporinas (AQP) estão presentes em um estado cristalino na membrana, o que implica que nem sua lateralidade ou sua mobilidade rotacional são essenciais para sua função¹³.

LOCALIZAÇÃO DOS CANAIS DE ÁGUA

A AQP1 foi a primeira AQP descoberta, inicialmente denominada de CHIP28. Encontrada em vários órgãos do trato gastrointestinal, no plexo coróide associado ao processo de secreção do líquor, no endotélio corneano, nos eritrócitos, no rim predominantemente na membrana plasmática basolateral do túbulo contornado proximal, além da expressão no endotélio dos capilares glomerulares, na região mesangial e na membrana plasmática apical e basolateral da porção delgada descendente da AH, na vasa recta e nos eritrócitos^{3,14,15,16,17,18,19}.

A AQP2 é também conhecida como WCH-CD e aparentemente é o único canal de água cuja função é regulada²⁰. Parece estar localizada exclusivamente no ducto coletor renal, predominantemente na membrana plasmática apical, além da membrana

plasmática basolateral da porção intramedular do ducto coletor^{21,22}.

A AQP3 foi descoberta na membrana basolateral das células principais do ducto coletor e inicialmente foi denominada de Basolateral Integral Membrane Protein (BLIP)²³. Posteriormente foi localizada nas células de revestimento dos ventrículos e superfície do cérebro, na membrana basolateral do ducto coletor, no pulmão, músculo esquelético, cólon, estômago e olho onde foi inicialmente denominada de Collecting Duct Glycerol Transporter (GLIP).

A AQP4, isolada inicialmente no cérebro; nas células de revestimento dos ventrículos e espaço subaracnóide, aparentemente envolvida no processo de reabsorção do líquor, inicialmente denominada *Mercurial-Insensitive Water Channel* (MIWC)²⁴, devido a particular característica de insensibilidade ao mercúrio conferida pela presença da alanina ligada à cisteína na posição do sítio de ligação do HgCl₂^{11,25}. Foi também localizada em pulmão, principalmente traquéia e brônquios, olho, nas glândulas salivares, nas células parietais gástricas, na glândula lacrimal, no fígado e na medula renal e na membrana basolateral das células principais dos ductos coletores medulares (IMDC), principalmente na porção inicial da IMDC com pequena fração presente em vesículas intracelulares distribuídas no citoplasma das células do DC^{26,27}.

A AQP5, a última AQP clonada e identificada até o momento, foi localizada na glândula salivar de rato, glândulas lacrimais, córnea e fígado²⁸ e, recentemente, isolada em glândula submaxilar de humanos²⁹.

FISIOLOGIA DAS AQUAPORINAS

Aproximadamente 3% das proteínas da membrana da borda em escova¹⁶ correspondem à AQP1 e a sua alta condutância por unidade sugerem que a reabsorção de água via transcelular no TP seja devido a ela³⁰. Quando se correlaciona o número de AQP1/mm de comprimento do túbulo com a unidade de condutância, verifica-se que a AQP sozinha poderia ser responsável pela reabsorção de água no TP, sugerindo que a reabsorção de água se dê preferencialmente por via transcelular no TP.

A expressão da AQP1 inicia-se no S1 do TP, principalmente na borda em escova e continua ininterruptamente até a porção delgada descendente da AH, onde se expressa tanto na membrana apical quanto na basolateral, porém sua expressão diminui à medida que o néfron se aprofunda na medula renal, concordando com as características

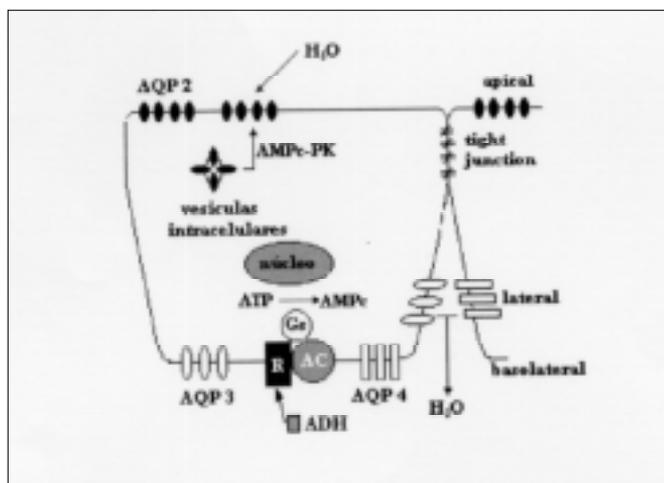


Fig. 4 - Distribuição das AQP nas células principais do ducto coletor. A vasopressina (ADH) liga-se aos receptores (R) e à proteína G (GS) mediando a ativação da adenil-ciclase (AC) a produzir AMPc com ativação da proteína quinase (PK). Sugere-se que isso resulte na externalização da Aqp2 para a membrana plasmática apical, aumentando a permeabilidade à água. As AQP3 e AQP4 localizam-se na membrana basolateral. (Adaptado de Nielsen^{9a}).

conhecidas de permeabilidade à água da AH^{16,31,32}.

Além disso, a localização da AQP1 no capilar glomerular fenestrado, bem como no capilar peritubular fenestrado sugere uma suposta via adicional de condução de água na barreira de filtração glomerular¹⁴.

Uma correlação funcional entre a AQP1 do rim e do eritrócito tem sugerido a hipótese de que a AQP1 torna o eritrócito capaz de se reidratar rapidamente após passar pela medula hipertônica³³.

Vários estudos têm evidenciado que a AQP2 é o único canal cuja função é regulada. Dois mecanismos fundamentais relacionados à permeabilidade do ducto coletor estão estabelecidos e ambos parecem envolver tanto a AQP2 quanto a vasopressina. Os receptores da vasopressina e seus mecanismos sinalizadores tem sido recentemente revisados por Knepper *et al.*³⁴. A vasopressina liga-se a uma proteína G heterométrica acoplada ao receptor de vasopressina (V2 receptor) que ativa a adenil-ciclase a produzir AMPc servindo como segundo mensageiro³⁵ (Fig. 4). Acredita-se que os efeitos celulares da AMPc possam estar conectados à ativação da proteínaquinase A, com fosforilação de várias proteínas, presumivelmente também, proteínas reguladoras, cujo resultado final resulta em aumento da permeabilidade à água³⁶. Entretanto, o complexo regulador também inclui inibição da permeabilidade à água devido ao papel do fosfoinosítide com mobilização transitória do cálcio^{37,38,39}.

No mecanismo de ação rápido a vasopressina aumenta a permeabilidade à água na membrana apical cuja taxa limita a barreira para transporte transepitelial⁴⁰. A permeabilidade à água aumenta em 30 a 40 segundos, com rápido decréscimo em 10 minutos acompanhada de um segundo menor aumento^{41,42}. A diminuição da permeabilidade após a remoção da vasopressina apresenta um tempo similar⁴³.

Três mecanismos gerais para a regulação a curto tempo tem sido proposto: a) aumento no número de canais de água funcionantes devido a, por exemplo, exocitose dos canais de água do reservatório intracelular da membrana plasmática; b) a unidade de condutância individual dos canais de água constitutivamente encontrados na membrana plasmática podem ser regulados; c) os dois mecanismos podem agir paralelamente, com modificação química (ativação) dos canais de água após externalização desses na membrana plasmática.

Nielsen *et al.*⁴⁴ realizaram um estudo com microscopia imunoelétrica de ducto coletor e túbulos perfundidos isoladamente nos quais a permeabilidade à água foi determinada durante diferentes fases de estimulação pela vasopressina e a retirada desta. Resultados preliminares sugeriram que a vasopressina induz uma mudança reversível na localização dos canais de água dos reservatórios (vesículas) intracelulares para a membrana apical, em paralelo com o aumento na permeabilidade à água⁴⁵. A liberação da AQP2 das vesículas citoplasmáticas ocorre através da interação destas vesículas com a VAMP2 (proteína de membrana transportadora de vesículas) após ser estimulada pelo AVP⁴⁶.

Um segundo mecanismo de ação envolve mecanismos de adaptação tardios onde a concentração urinária é dependente de outros fatores. O ducto coletor da medula interna (IMCD) exhibe uma permeabilidade à água mesmo na ausência da vasopressina^{41,43,47}. A sede aumenta a permeabilidade basal à água nos ductos coletores medulares em 48 horas através de um aumento na expressão da AQP2 na medula renal, tanto quanto ao aumento das vesículas subapicais quanto ao importante aumento na membrana plasmática apical^{47,48}.

Apesar da perda da cisteína na posição 189, a qual é crítica para o bloqueio pelo mercúrio na AQP1, a AQP3 ainda apresenta sensibilidade ao mercúrio. Outra importante característica desta proteína é que até o momento é o único canal que transporta outras moléculas em adição à água, no caso o transporte de pequenas moléculas não iônicas como a uréia e o glicerol. O transporte de uréia é crítico para a concentração urinária. No

entanto, o papel da AQP3 como transportador de uréia no ducto coletor medular além do já clonado transportador de uréia UT2 ainda não é conhecido⁴⁹. Sabe-se somente que a AQP3 parece ter um importante papel na saída de água e uréia na membrana basolateral das células principais do ducto coletor.

A AQP4 é um canal recentemente isolado do cérebro e insensível ao mercúrio²⁶, semelhante ao MIWC identificado no fígado e em outros tecidos, porém as diferenças no sítio inicial de translação e região codificadora do MIWC parece ter resultado em uma marcada redução da permeabilidade à água da AQP4²⁴ em relação ao MIWC. Hibridização *in situ* do cérebro revelou um forte sinal para a AQP4 através de vários tecidos neurais, incluindo núcleo paraventricular e supraóptico com projeção terminal de axônios para a neurohipófise. Esses neurônios contêm osmoreceptores responsáveis a pequenas alterações na osmolalidade levando à ativação de canais catiônicos mecanossensíveis e liberando vasopressina⁵⁰. Portanto, a AQP4 no cérebro detecta ser mais um osmoreceptor através do que o sistema nervoso central percebe a necessidade de diurese visando o controle do volume extracelular²⁴.

Terris *et al.*⁵¹ demonstraram a expressão da AQP4 na membrana basolateral das células do ducto coletor intramedular (IMDC), sugerindo que existiria um possível papel da AQP4 na saída de água. Apesar de ter encontrado pequena quantidade da AQP4 nas vesículas citoplasmáticas, eles propõem que na realidade essas vesículas representem uma nova síntese em trânsito do aparelho de Golgi para a membrana plasmática e não uma regulação da ação dessa, como ocorre com a AQP2.

Fisiopatologia

Estudos com ratos Brattleboro demonstraram que estes manifestam Diabetes Insipidus pela ausência de secreção da vasopressina. Esses ratos somente expressam AQP2 após infusão de vasopressina⁵².

O tratamento crônico com o lítio diminui dramaticamente a expressão de AQP2 nos ductos coletores medulares levando a um declínio na osmolalidade urinária e a um aumento da polidipsia e a uma severa poliúria⁵³. Isso pode ser parcialmente revertido pela sede ou pela administração de DDAVP exógeno (em menor intensidade), porém a recuperação espontânea após cessar o uso do lítio é muito demorada. O lítio inibe o aumento do AMPc promovido pela vasopressina, bloqueando a sua ação, o que pode ser a causa da diminuição da expressão da AQP2.

Fujita *et al.*⁵⁴ demonstraram que em ratos com síndrome da secreção inapropriada do hormônio

antidiurético (SIADH), a infusão de DDAVP promove um aumento da AQP2. Também demonstraram que a expressão de AQP2 estava aumentada em ratos cirróticos descompensados e, ao se utilizar um bloqueador da vasopressina (OPC-31260), ocorreu uma importante diminuição da expressão da AQP2. Esse estudo sugere que a AQP2 desempenha um importante papel na retenção de água nos estados patológicos da SIADH e da cirrose hepática.

Sands *et al.*⁵⁵, estudando a causa da diminuição da habilidade de concentrar a urina em pacientes com dieta hipoprotéica, encontraram aumento da reabsorção da uréia na porção inicial da IMCD e diminuição da reabsorção de água na porção terminal do IMCD em ratos com dieta hipoprotéica. Aparentemente essas alterações ocorriam em consequência da redução do AVP na porção terminal do IMCD. Essa diminuição do AVP levava a diminuição da expressão da AQP2 nessa região. O mecanismo proposto difere de outros experimentos como ratos hipocalêmicos e ratos Brattleboro onde as alterações na expressão da AQP2 ocorre ao longo de todo TC, tanto no córtex quanto na medula.

Outras formas de Diabetes Insipidus Nefrogênico induzido por distúrbios metabólicos (hipocalcemia e hipercalcemia) ou por desordens metabólicas, pós-obstrutivas ou diurese osmótica também parecem estar associadas às alterações nos níveis de AQP2⁵⁶. Marples *et al.*⁵⁷, estudando ratos submetidos à dieta hipocalêmica crônica, que apresentavam defeito na concentração urinária, observaram que a poliúria desenvolvia-se por uma diminuição da expressão da AQP2. Após uma semana de retorno à dieta normal, a expressão da AQP2 e os parâmetros fisiológicos dos ratos voltaram ao normal. Sugeriram que o mecanismo pelo qual a hipocalcemia leva ao Diabetes Insipidus parece ser devido à diminuição da produção do AMPc^{44,58} em resposta à vasopressina, seja por inibição direta da adenilciclase ou via aumento da produção das PGs.

Mutações nas aquaporinas e estados clínicos

Recentemente têm sido identificadas mutações nas regiões de codificação das aquaporinas em humanos. A identificação de pacientes, adquiridas através de base de dados clínicas e o fenotipo desses pacientes, tem promovido sinais surpreendentes para a importância fisiológica dessas moléculas. O sítio do locus da AQP1 no cromossoma humano 7p14⁵⁹ coincidiu com o grupo antigênico do sangue Colton⁶⁰. A AQP1 foi seletivamente precipitada com anti-CoA e anti-CoB do soro e a

superfície polimórfica Ala-Val foi estabelecida no resíduo 45⁶¹. Amostras de urina e sangue periférico foram analisadas sendo encontradas três famílias com perda da proteína. A análise biofísica dos glóbulos vermelhos confirmaram um marcante reduzido Pf que não apresentava sensibilidade ao mercúrio⁶². A análise genômica do DNA confirmou que a probanda de cada familiar era homocigoto para uma diferente mutação na AQP1. Nenhum dos três apresentavam qualquer sintomatologia clínica significativa, apesar dos glóbulos vermelhos desses indivíduos demonstrarem 80% de redução no transporte de água.

Humanos com mutações na AQP2 foram identificados entre pacientes com Diabetes Insipidus Nefrogênico (DIN), uma herança ligada ao cromossoma X^{63,64,65}. Pacientes com DIN com cDNA receptor V2 normal foram examinados para analisar defeitos no cDNA da AQP2. O primeiro paciente humano que apresentou o defeito na AQP2 era um heterocigoto com duas mutações, que demonstravam ser disfuncionais quando expressado em oócitos⁶⁶. Semelhante à mutação da AQP1, esses indivíduos foram afetados com um severo defeito na concentração renal e disfunção neurológica secundária, aparentemente resultando em desidratações na infância⁶⁶. Esses achados indicaram que as mutações no gene da AQP2 causa DIN recessivo. Outras três famílias com DIN foram descritas⁶⁷. As mulheres apresentavam aspectos clínicos semelhante ao fenótipo dos homens. A osmolalidade urinária máxima nas três mulheres não excedeu 200 mOsmol/Kg e a ausência de resposta extrarenal ao 1-desamino-8-D-arginina vasopressina foi demonstrada em duas delas. Todas as mulheres afetadas e duas mulheres assintomáticas eram heterocigotas para uma mutação do AVPR2. Concluiu-se que em mulheres DIN, a possibilidade de heterocigotidade para mutação de AVPR2 deve ser considerada para mutações no gene da AQP2.

Alguns estudos têm sido realizados para determinar se a excreção urinária de AQP2 pode ser um marcador da resposta do ducto coletor à vasopressina para que este possa ser utilizado na avaliação clínica de pacientes com desordens do balanço de água⁶⁸.

Kageyama *et al.*⁶⁹ demonstraram expressão da AQP1 e AQP2 nas células do carcinoma de células renais, sugerindo que o túbulo proximal e o ducto coletor possam dar origem a esse tumor.

Perspectivas de tratamento

Uma importante implicação da descoberta das aquaporinas na prática clínica é o desenvolvimento

de agentes que poderiam inibir a função dos canais de água, possivelmente uma nova categoria de diuréticos, os aquaréticos⁷⁰.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Schafer JA, Reeves WR, Andreoli TE. Mechanisms of fluid transport across renal tubules. In: Windhager EE ed. *Handbook of Physiology*, Renal Physiology, section 8, New York, New York 1992, 659-714.
2. Finkelstein A. *Water movement through lipid bilayers, pores and plasma membrane: theory and reality*. New York, John Wiley & Sons, 1987.
3. Agre P, Preston GM, Smith BL *et al.* Aquaporin CHIP: The archetypal molecular water channel. *Am J Physiol* 1993; 265: F463-476.
4. Preston GM, Agre P. Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 Kd: Member of an ancient channel family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:11.110-14.
5. Engel A, Wals T, Agre P. Structure of the aquaporin water channels. *Curr Opin Struct Biol* 1994; 4: 545-53.
6. Jung JS, Preston GM, Smith BL, Guggino WB, Agre P. Molecular structure of the water channel through Aquaporin CHIP: The hourglass model. *J Biol Chem* 1994; 269: 24.648-654.
- 6.a. Verkman AS, Shi LB, Frigeri A *et al.* Structure and function of kidney water channels. *Kidney Int* 1995; 48: 1.069-81.
7. Waltz T, Smith BL, Agre P, Engel A. The three-dimensional structure of human erythrocyte aquaporin. *Chip. Embo J* 1994; 13: 2.985-93.
8. Winstow GJ, Pisano MM, Chepelinsky AB. Tandem sequence repeats in transmembrane channel protein. *Trends Biochem Sci* 1991; 16: 170-71.
9. Reizer J, Reizer A, Saier MHJ. The MIP family of integral membrane channel proteins: Sequence comparisons, evolution, and proposed functional differentiation of the two repeated halves of the proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1993; 28: 235-57.
- 9a. Nielsen S, Agre P. The aquaporin family of water channels in kidney. *Kidney Int* 1995; 48: 1057-68.
10. Verbavatz JM, Brown D, Sabolic I *et al.* Tetrameric assembly of CHIP28 water channels in liposomes and cell membranes: A freeze-fracture study. *J Cell Biol* 1993; 123:605-18
11. Preston GM, Jung JS, Guggino WB, Agre P. The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel. *J Biol Chem* 1993; 268:17-20.
12. Calamita G, Bishai WR, Preston GM, Guggino WB, Agre P. Molecular Cloning and characterization of AQPz, a water channel from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1995; 270:29.063-66
13. Von Hoek AN, Hom ML, Luthjnes LH *et al.* Functional unit of 30 kD for proximal tubule water channels as revealed by radiation inactivation. *J Biol Chem* 1991; 266: 16.633-35.
14. Maunsbach AB, Marples D, Chin E *et al.* Aquaporin-1 water channel expression in human kidney. *J. Am. Soc. Nephrol* 1997; 8: 1-14.
15. Denker BM, Smith BL, Kuhajda FP, Agre P. Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. *J Biol Chem* 1988; 263: 15.634-42.
16. Nielsen S, Smith B, Christensen EI, Knepper MA, Agre P. CHIP28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron. *J Cell Biol* 1993; 120: 371-83.
17. Bondy C, Chin E, Smith BL, Preston GM, Agre P. Developmental gene expression and tissue distribution of the CHIP28 water channels protein. *Proc Natl Acad*

- Sci USA*. 1993; 90:4.500-504
18. Hasegawa H, Zhang R, Dohrman A, Verkman AS. Tissue-specific expression of mRNA encoding rat kidney water channel CHIP28 by in situ hybridization. *Am J Physiol* 1993; 264:C237-C245.
 19. Sabolic I, Valenti G, Verbavatz JM *et al* Localization of the CHIP28 water channels in rat kidney. *Am J Physiol* 1992; 263:C1225-C1233.
 20. Brown D, Katsura T, Kawashima M, Verkman AS, Sabolic I: Cellular Distribution of the aquaporins: a family of water channels proteins. *Histochem Cell Biol* 1995; 104(1):1-9.
 21. Fushimi K, Uchida S, Hara Y *et al*. Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature* 1993; 361:549-52.
 22. Nielsen S, Digiovanni SR, Christensen EI, Knepper MA, Harris HW. Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressin-regulated water channel in rat kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:11.663-67.
 23. Ishibashi K, Sasaki S, Fushimi K, *et al*. Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and ureia in addition to water expressed at the basolateral membrane of a kidney collecting duct cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:13.052-56.
 24. Jung JS, Bhat V, Preston GM *et al*. Molecular characterization of an Aquaporin cDNA from brain: Candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:13.052-56.
 25. Shi LB, Verkman AS. Selected cysteine point mutations confer mercurial sensitivity to the mercurial-insensitive water channel MIWC/AQP4. *Biochemistry* 1996, 35(2):538-44.
 26. Hasegawa H, Ma T, Skach W, Matthay MA, Verkman AS. Molecular cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues. *J Biol Chem* 1994; 269: 5.497-500.
 27. Terris J, Ecelbarger CA, Marples D, Knepper MA, Nielsen S. Distribution of aquaporin-4 water channel expression within rat kidney. *Am J Physiol* 1995; 269: F775-F785.
 28. Raina S, Preston GM, Guggino WB, Agree P. Molecular cloning and characterization of an aquaporin cDNA from salivary, lacrimal, and respiratory tissues. *J Biol Chem* 1995; 270(4): 1.908-12.
 29. Lee MD, Bhakta KY, Raina S *et al*. The human Aquaporin-5 gene. Molecular characterization and chromosomal localization. *J Biol Chem* 1996; 271(15): 8.599-614.
 30. Zeidel ML, Ambudkar SV, Smith BL, Agree P. Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein. *Biochemistry* 1992; 31:7.436-40.
 31. Chou CL, Knepper MA. In vitro perfusion of chinchilla thin limb segments: Segmentation and osmotic water permeability. *Am J Physiol* 1992; 263: F417-F426
 32. Chou CL, Nielsen S, Knepper MA. Structural-functional correlation in chinchilla long loop of Henle thin limbs: A novel papillary subsegment. *Am J Physiol*. 1993; 265:F863-F874.
 33. Smith BL, Baungarten R, Nielsen S *et al*. Concurrent expression of erythroid and renal aquaporin and appearance of water channel activity in perinatal rats. *J Clin Invest* 1993; 92:2.035-41.
 34. Knepper MA, Nielsen S, Chou CL, Digiovanni SR. Mechanism of vasopressin action in the renal collecting duct. *Semin Nephrol* 1994; 14:302-21.
 35. Morel A, O'Carroll AM, Brownstein MJ, Lolait SJ. Molecular cloning and expression of a rat V1a arginine vasopressin receptor. *Nature*. 1992; 356:523-26.
 36. Dousa TP, Sands H, Hechter O. Cyclic AMP-dependent reversible phosphorylation of renal medullary plasma membrane protein. *Endocrinology* 1972; 91:757-63.
 37. Star RA, Nonoguchi H, Balaban R, Knepper MA. Calcium and cyclic adenosine monophosphate as second messenger for vasopressin in the rat inner medullary collecting duct. *J Clin Invest* 1988; 81:1.879-88.
 38. Maeda Y, Terada Y Nonoguchi H, Knepper MA. Hormone and autacoid regulation of cAMP production in rat IMCD subsegments. *Am J Physiol* 1992; 263:F319-F327.
 39. Hans JS, Maeda Y, Knepper MA. Dual actions of vasopressin and oxytocin in regulation of water permeability in terminal collecting duct. *Am J Physiol* 1993; 265:F26-F34.
 40. Flamion B, Spring KR. Water permeability of apical and basolateral cell membranes of rat inner medullary collecting duct. *Am J Physiol* 1992; 259:F986-F998.
 41. Wall SM, Han JS, Chou CL, Knepper MA. Kinetics of urea and water permeability activation by vasopressin in rat terminal IMCD. *Am J Physiol* 1992; 262:F989-F998
 42. Kuwahara M, Shi LB, Marumo F, Verkman AS. Transcellular water flow modulates water channel exocytosis and endocytosis in kidney collecting tubule. *J Clin Invest*. 1991; 88:423-9.
 43. Nielsen S, Knepper MA. Vasopressin activates collecting duct urea transporters and water channel by distinct physical processes. *Am J Physiol* 1993; 265:F204-F213.
 44. Nielsen S, Chou CL, Marples D *et al*. Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:1.013-17.
 45. Brown D, Weyer P, Orci L. Vasopressin stimulates endocytosis in kidney collecting duct principals cell. *Eur J Cell Biol* 1988; 46:336-41.
 46. Nielsen S, Marples D, Birn H *et al*. Expression of Vamp2-like protein in kidney collecting duct intracellular vesicles. *J Clin Invest* 1995; 96:1.834-44.
 47. Lankford SP, Chou CL, Terada Y, Wall SM, Wade JB, Knepper MA. Regulation of collecting duct water permeability independent of cAMP-mediated AVP response. *Am J Physiol* 1994; 261:F723-F730.
 48. Wade JB, Nielsen S, Coleman RA, Knepper MA. Long-term regulation of collecting duct water permeability: Freeze-fracture analysis of isolated perfused tubules. *Am J Physiol* 1994; 266:F723-F730.
 49. You G, Smith CP, Kanai Y *et al*. Cloning and characterization of the vasopressin-regulated urea transporter. *Nature* 1993; 365:844-7.
 50. Oliet SH, Bourque CW. Mechanosensitive channels transduce osmosensitivity in supraoptic neurons. *Nature* 1993; 364:341-3.
 51. Terris J, Ecelbarger CA, Marples D, Knepper MA, Nielsen S. Distribution of aquaporin-4 water channel expression within rat kidney. *Am J Physiol* 1995; 269:F775-F785.
 52. Digiovanni SR, Nielsen S, Christensen EI, Knepper MA. Regulation of collecting duct water channel expression by vasopressin in Blatteboro rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:8.984-88.
 53. Marples D, Christensen S, Christensen EI, Ottosen PD, Nielsen S. Lithium-induced downregulation of aquaporin-2 water channel expression in rat kidney medulla. *J Clin Invest* 1995; 95:1.838-45.
 54. Fujita N, Ishikawa S, Sasaki S *et al*. Role of water channel AQP-CD in water retention in SIADH and cirrotic rats. *Am J Physiol* 1995; 269:F926-F931.
 55. Sands J, Naruse M, Jacobs JD, Wilcox JN, Klein J. Changes in aquaporin-2 protein contribute to the urine concentrating defect in rats fed a low-protein diet. *J Clin Invest* 1996; 97(12):2.807-14.
 56. Howard RL, Bichet DG, Schrier RW. Hypertremic and polyuric states. In: The Kidney. *Physiology and Pathophysiology*. DW Seldin and G Giebisch, editors. Raven Press, New York 1992, 1753-78.

57. Marples D, Frokiaer J, Dorup J, Knepper MA, Nielsen S. Hypokalemia-induced down regulation of aquaporin-2 water channel expression in rat kidney medulla and cortex. *J Clin Invest* 1996; 97(8): 1960-68.
58. Beck N, Webster. Impaired urinary concentrating ability and cyclic AMP in K⁺-depleted rat kidney. *Am J Physiol* 1976; 231:1.204-208.
59. Moon C, Preston GM, Griffin CA, Jabs EW, Agre P. The human aquaporin-CHIP gene: Structure, organization, and chromosomal localization. *J Biol Chem* 1993; 268:15.722-78.
60. Zelinski T, Kaita H, Gilson T et al. Linkage between the Colton blood group locus and ASSP11 on chromosome 7. *Genomics*. 1990; 6:623-25.
61. Smith BL, Preston GM, Spring FA, Anstee DJ, Agre P. Human red cell aquaporin CHIP.I. Molecular characterization of ABH and Colton blood group antigens. *J Clin Inv* 1994; 94:1.043-49
62. Preston GM, Smith BL, Zeidel ML, Moulds JJ, Agre P. Mutations in aquaporin-1 in phenotypically normal humans without functional CHIP water channels. *Science* 1994; 265:1.585-87.
63. Merendino JJJ, Speigel AM, Crawford JD et al. Brief report: a mutation in the vasopressin V2-receptor gene in a kindred with X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *N Engl J Med* 1993; 328:1.538-41.
64. Lolait SJ, O'Carroll AM, McBried OW et al. Cloning and characterization of a vasopressin V2 receptor and possible link to nephrogenic diabetes insipidus. *Nature* 1992; 357:336-9.
65. Rosenthal W, Seibold A, Antaramian A et al. Molecular identification of the gene responsible for congenital nephrogenic diabetes insipidus. *Nature* 1992; 359:233-5.
66. Deen PM, Verdijk MA, Knoers NV et al. Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine. *Science* 1994; 264:92-5.
67. Lieburg AF van, Verdijk MAJ, Schout F et al. Clinical Phenotype of nephrogenic diabetes insipidus in females heterozygous for a vasopressin type 2 receptor mutation. *Hum Genet* 1995; 96(1):70-8.
68. Elliot S, Goldsmith P, Knepper M, Haughey M, Olson B. Urinary excretion of aquaporin-2 in humans: a potential marker of collecting duct responsiveness to vasopressin. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7(3):403-9.
69. Kageyama Y, Sasaki S, Yamura Y, Oshima H, Ikawa Y. Water channel protein subtype suggest the origin of renal cell carcinoma. *J Urol* 1996; 156(1):291-5.
70. Lieburg AF van, Knoers VVAM, Deen PMT. Discovery of aquaporins: a breakthrough in research on renal water transport. *Pediatr Nephrol* 1995; 9:228-34.