

SŁAWOMIR PIKUŁA

Zakład Biochemii Komórki

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Pasteura 3, 02-093 Warszawa

e-mail: s.pikula@nencki.gov.pl

WODA MORSKA I DZIURY W BŁONACH – NAGRODA NOBLA Z CHEMII ZA ROK 2003

WSTĘP

W 1941 r. na łamach „Studies from the Institute of Medical Chemistry” Uniwersytetu w Szeged, Albert von Szent-Györgyi Nagyrápolt, węgierski biochemik i badacz mechanizmu skurczu mięśni oraz odkrywca witaminy C¹, wyraził proroczą myśl: „W swoich badaniach zawsze kierowałem się przeświadczeniem, że podstawowe funkcje materii ożywionej pochodzą od jonów, jedynych użytecznych „narzędzi”, jakie życie odnalazło w morskiej wodzie, w której powstało”.

Sześćdziesiąt lat później przeświadczenie wielkiego Węgra przerodziło się w pewność, między innymi dzięki pracom amerykańskich laureatów Nagrody Nobla w dziedzinie chemii, Petera Agre z Johns Hopkins University School of Medicine w Baltimore i Rodericka MacKinnona z Howard Hughes Medical Institute, The Rockefeller University w Nowym Jorku.

Ósmego października 2003 r. Szwedzka Królewska Akademia Nauk postanowiła uhonorować obu badaczy za ich odkrycia dotyczące kanałów zlokalizowanych w błonach komórkowych, przyznając w równych częściach nagrodę Peterowi Agre, za odkrycie kanałów, przez które transportowane są cząsteczki wody, nazwanych akwaporynami, i Roderickowi MacKinnonowi, za badania struk-

turalne pozwalające na określenie mechanizmu transportu jonów przez kanały jonowe (przede wszystkim kanały potasowe), ze szczególnym uwzględnieniem procesu zamykania i otwierania kanału, jego zdolności do selektywnego transportu tylko określonego typu jonów oraz wrażliwości na zmiany potencjału elektrycznego błony.

Spróbujmy odpowiedzieć na pytanie, czym kierowali się członkowie komitetu Nagrody Nobla, uznając prace obu badaczy za przełomowe dla zrozumienia procesów transportu cząsteczek wody i jonów przez błony biologiczne?

Życie na naszej planecie narodziło się najprawdopodobniej w oceanie. Jedną z przesłank pozwalających na sformułowanie takiego przypuszczenia stanowi fakt, że płyny ustrojowe w organizmie człowieka mają wartość pH i ciśnienie osmotyczne podobne do wody morskiej. Zawierają one także jony sodu, potasu i jony chlorkowe, obecne powszechnie w wodzie morskiej. Jednak pomiędzy stężeniem wymienionych jonów wewnątrz i na zewnątrz komórki, na przykład w płynach ustrojowych, istnieje znacząca różnica (Tabela 1). Różnica ta jest życiodajna, bo sprawia, że pomiędzy wnętrzem komórki a środowiskiem zewnętrznym

¹ Albert von Szent-Györgyi Nagyrápolt za odkrycie witaminy C otrzymał nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii/medycyny w 1937 r.

Tabela 1. Porównanie składu jonowego cytoplazmy typowej komórki człowieka ze składem jonowym osocza krwi

Jon	Stężenie jonów (w molach na litr)	
	w cytoplazmie komórki	w osoczu
K ⁺	0,139	0,004
Na ⁺	0,012	0,145
Mg ²⁺	0,008	0,0015
Ca ²⁺	< 0,2 x 10 ⁻⁶ *	0,0018
Cl ⁻	0,004	0,116
HCO ₃ ⁻	0,012	0,029
X ⁻	0,138 **	0,009 **

*Wartość stężenia jonów wapnia podano w Tabeli dla komórek w stanie spoczynku; w wyniku pobudzenia komórki i otwarcia kanałów transportujących jony wapnia, ich stężenie w cytoplazmie może wzrosnąć nawet do wartości 1,2 x 10⁻⁶ mola na litr. W wyniku ustania sygnału pobudzającego i pracy pomp wapniowych, usuwających jony wapnia z cytoplazmy do wewnątrzkomórkowych magazynów tego kationu oraz poza komórkę, przywrócone zostaje niskie stężenie kationu w cytoplazmie (poniżej 0,2 x 10⁻⁶ mola na litr). ** W pH 7,0 wiele białek komórki (oznaczonych w Tabeli symbolem X⁻) charakteryzuje się wypadkowym ładunkiem ujemnym. Dlatego w tabeli uwzględniono szacunkową wartość stężenia tych białek, ze względu na ich znaczenie dla ogólnej równowagi jonowej panującej w cytoplazmie każdej „zdrowej” komórki.

powstaje gradient stężeń określonych jonów, który jest motorem napędowym szeregu procesów biologicznych, między innymi wytwarzania energii. Z drugiej strony organizm musi bronić się zarówno przed niekontrolowanym

napływem wody do wnętrza komórek i zmianami wewnątrzkomórkowego ciśnienia, jak i przed utratą wewnątrzkomórkowej równowagi jonowej.

AKWAPORYNY I KANAŁY TRANSPORTUJĄCE JONY POTASU

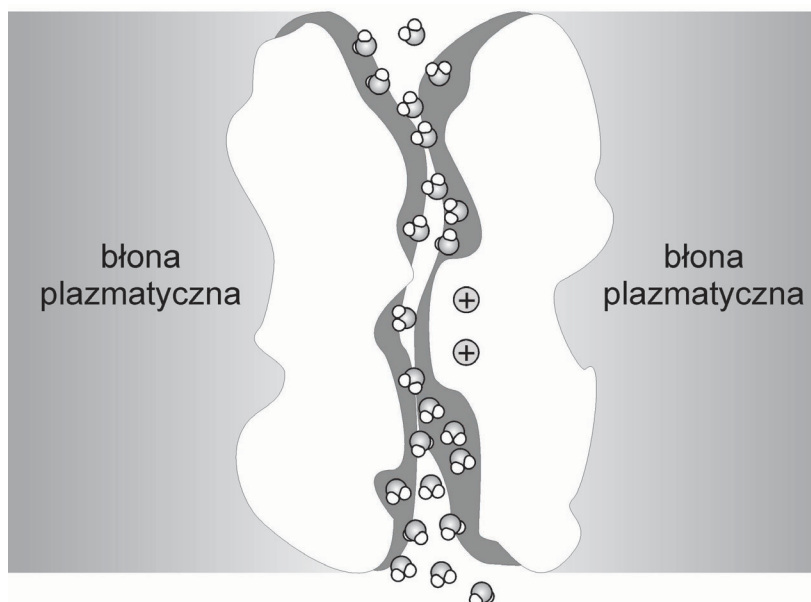
Od dawna przypuszczano, że dla podtrzymania właściwych funkcji komórek, woda musi przenikać przez pory w błonie komórkowej. Z drugiej jednak strony identyfikacja tych porów i zasady ich funkcjonowania spędzały sen z powiek wielu pokoleń badaczy, pozostając długo jednym z nierozwiązanych problemów nauki.

Już w latach 50. XX w. wysunięto przypuszczenie, że cząsteczki wody muszą być transportowane przez pory w błonach, które przepuszczają selektywnie tylko te właśnie cząsteczki. W ciągu następnych dziesięcioleci zdumienie społeczności naukowej wzrastało, bo oto miliardy pozbawionych ładunku elektrycznego cząsteczek wody mogły w ciągu sekundy przenikać przez pojedynczy por, zaś naładowane elektrycznie jony – nie. Analogia z kanałami jonowymi nasuwała się sama – w świetle kanału transportującego cząsteczki wody musi istnieć „filtr selektywności” zapobiegający transportowi innych cząsteczek i jonów.

W 1992 r. Peter Agre, który wcześniej zajmował się badaniami białek błon erytrocytów, zidentyfikował jedno z nich (białko CHIP) jako kanał transportujący cząsteczki wody. W osiem lat później, wraz ze swoimi współpracownikami, opublikował pierwszą trójwymiarową strukturę akwaporyny (AQP1). Między innymi na tej podstawie stwierdzono, że akwaporyny są tetramerycznymi integralnymi białkami błon. Każdy z monomerów o masie cząsteczkowej 28 kDa jest zdolny do transportu cząsteczek wody i jest zbudowany z dwóch powtarzających się segmentów, zawierających trzy domeny transbłonowe tworzące wąski kanał, przez który są transportowane cząsteczki wody. Lokalne pole elektryczne w świetle tego kanału, wytwarzane przez zjonizowane reszty aminokwasowe, z których zbudowana jest ściana kanału, z jednej strony wspomaga transport cząsteczek wody, z drugiej zaś zapobiega „ucieczce” z komórki protonów i transportowi innych, obdarzonych ładunkiem elektrycz-

nym, cząsteczek (Ryc. 1). Ta ostatnia obserwacja nabiera szczególnej wagi w świetle ogólnie znanego faktu, że różnica stężeń protonów pomiędzy środowiskiem zewnętrznym a wnętrzem komórki ma podstawowe znaczenie dla metabolizmu energetycznego komórek. Akwa-

gnały elektryczne, które można mierzyć w tkankach w warunkach przyżyciowych, są wynikiem transportu jonów przez błonę komórkową. Intuicja naukowa niemieckiego badacza jest godna pozazdroszczenia, bo w XX w. wykazano bez wątpliwości, że to zmiany stężenia jo-



Ryc. 1. Mechanizm selektywności kanału transportującego cząsteczki wody (AQP1).

Cząsteczki wody są transportowane poprzez wąski por w centrum akwaporyny 1 (AQP1). Por ten nie ma połączenia z hydrofobowym wnętrzem błony, w której akwaporyna jest zlokalizowana. Transport wody zachodzi dzięki lokalnemu polu elektrycznemu wytwarzanemu przez grupy atomów, z których zbudowane są ściany wewnętrzne pora. Cząsteczki wody ulegają reorientacji w polu elektrycznym, w miarę ich przemieszczania się wewnątrz kanału. Protony (lub raczej jony oksoniowe H_3O^+), ze względu na swój dodatni ładunek elektryczny, ulegają zastopowaniu przez zlokalizowaną od strony światła pora, naładowaną dodatnio grupę atomów stanowiących „filtr selektywności” AQP1 (na rycinie „filtr selektywności” oznaczono jako $\oplus \oplus$). Filtr zapobiega „ucieczce” protonów przez kanał transportujący cząsteczki wody. Rycinę opracowano na podstawie informacji zawartych na stronie internetowej Muzeum Nagrody Nobla (Press Release: The Nobel Prize in Chemistry 2003).

poriny okazały się także lekarstwem na szok osmotyczny, jaki komórki napotykały w środowisku zewnętrznym w trakcie ewolucji.

W tym też okresie zdawano sobie również sprawę, że nie tylko cząsteczki wody są transportowane przez błony z i do komórek. Panoowało także powszechne przeświadczenie, że jony i specyficzne związki niskocząsteczkowe są odpowiedzialne za regulację wszystkich funkcji życiowych komórek i za ich wzajemne komunikowanie się w tkankach, na terenie organów i w całym organizmie.

W 1890 r. fizykochemik niemiecki Wilhelm Ostwald² jako pierwszy zaproponował, że sy-

nów w cytoplazmie komórek, związane z tempem ich transportu przez błony, stanowią najdoskonalwsze „narzędzie” regulacji wszelkich procesów życiowych.

Za tym stwierdzeniem pojawiła się w latach 20. XX w. koncepcja kanałów jonowych, a w mniej więcej trzydzieści lat później badacze brytyjscy Alan Hodgkin i Andrew Huxley³ wykazali, że transport jonów sodu i potasu przez błonę komórki nerwowej jest sygnałem przekazywanym od komórki do komórki w układzie nerwowym.

Jony sodu są odpowiedzialne za wzrost ciśnienia osmotycznego wewnątrz komórek. Przy

²Wilhelm Ostwald otrzymał nagrodę Nobla w dziedzinie chemii w 1909 r.

³Alan Hodgkin i Andrew Huxley, wraz z Australijczykiem Johnem Carew Ecclesem, zostali uhonorowani nagrodą Nobla w dziedzinie fizjologii/medycyny w 1963 r. za ich fundamentalne prace dotyczące roli jonów sodu i potasu w powstawaniu i przesyłaniu impulsu nerwowego.

braku systemów transportu jonów sodu z komórek oraz utracie mechanizmów obronnych, komórki popękałyby w wyniku wzmożonego napływu wody do ich wnętrza. By temu zapobiegać, w toku ewolucji wytworzyły się odporne na stres mechaniczny ściany komórek roślinnych (zapobiegające pęcznieniu komórek), szkielet błony (stanowiący mechaniczną podporę błon plazmatycznych komórek roślin i zwierząt) oraz systemy transportu cząsteczek wody (akwaporyny) i jonów⁴, które zlokalizowane są w błonach biologicznych.

Do prawidłowego przebiegu procesów życiowych, komórki wymagają stosunkowo wysokiego stężenia jonów potasu w cytoplazmie (około 0,14 mola na liter), podczas gdy stężenie jonów sodu musi być utrzymywane, jak już wspomniano, na niskim poziomie (około 0,01 mola na liter). Wszystko wskazuje na to, że komórki całkiem dobrze „radzą” sobie z ciśnieniem osmotycznym wytwarzanym przez jony potasu, ale nie przez jony sodu. Czy zatem świat pradawnych mórz był bogaty w jony potasu?

Zmiany stężenia jonów, na przykład jonów wapnia, pełnią w komórkach funkcję przekaźnika informacji. Ich stężenie musi podlegać ściśle kontrolowanym zmianom. Ponieważ jony nie przenikają łatwo przez błony, dlatego w toku ewolucji wykształciły się białka transportujące jony, jako niezbędny czynnik zachowania równowagi jonowej w komórce. Białka te dzielimy obecnie na trzy grupy, różniące się mechanizmem transportu: pompy jonowe, wymienniki jonowe i kanały jonowe.

Tak jak w przypadku akwaporyn, od dawna wiadano o istnieniu kanałów jonowych i ich centralnej roli w funkcjonowaniu komórek. Nie wiadano jednak, w jaki sposób kanały te zapewniają transport jonów tylko w jednym kierunku? Zadawano sobie także pytanie, co powoduje, że kanały te otwierają się i zamykają we właściwym momencie, oraz dlaczego przepuszczają tylko określony typ jonów?

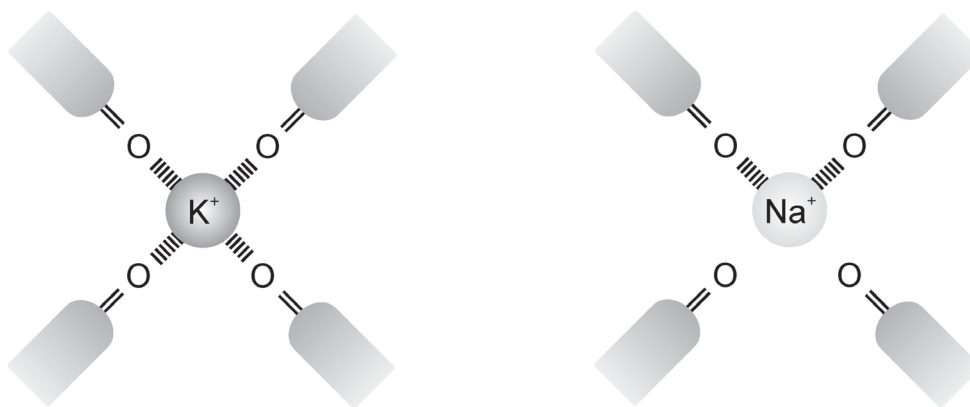
W latach 70. XX w. pojawiła się koncepcja „filtra selektywności”, w którym odpowiednie ugrupowania atomów tlenu w świetle kanału, zapewniają właściwe przestrzenne otoczenie

określonym jonom (jony przed wejściem do kanału zostają pozbawione swojej otoczki hydratacyjnej), a jednocześnie zapobiegają przemieszczaniu się przez kanał innych jonów.

Badaczom do sprawdzenia tej hipotezy brakowało, bagatela, struktury kanału, zwłaszcza kanału potasowego, opisanej z wysoką, atomową rozdzielczością. W kwietniu 1998 r. Roderick MacKinnon przedstawił międzynarodowemu gronu naukowemu pierwszą strukturę kanału potasowego uzyskaną z bardzo wysoką rozdzielczością metodą dyfrakcji promieni X; był to kanał KcsA z błon bakterii *Streptomyces lividans*. Na przykładzie tego kanału po raz pierwszy zdano sobie sprawę, w jaki sposób działa kanał jonowy i na czym polega mechanizm jego selektywności w stosunku do określonego typu jonów; w przypadku kanałów potasowych chodzi oczywiście o jony potasu. Kanały potasowe są integralnymi białkami błony zbudowanymi z czterech podjednostek otaczających zlokalizowany centralnie por, przez który transportowane są jony. Każda z podjednostek zawiera dwie równoległe w stosunku do siebie α -helisy o długości odpowiadającej grubości błony, tworzące ściany kanału, i jedną krótszą α -helisę, eksponowaną do światła pora, zorientowaną w stosunku do dłuższych helis pod pewnym kątem. W centrum kanału znajduje się przestrzeń o średnicy około 10 Å, która nie tylko umożliwia przepływ jonów przez błonę, ale stanowi „filtr selektywności” kanału. Mechanizm selektywności kanału w stosunku do jonów potasu przedstawiono na Ryc. 2.

Roderick MacKinnon wraz ze współpracownikami wykazał ponadto, że zdolność komórek do kontrolowania otwierania i zamykania kanałów jonowych wynika z obecności w cząsteczkach tych białek rodzaju bramki połączonej z odpowiednim molekularnym czujnikiem, położonym w pobliżu tej bramki. Czujniki te, w zależności od typu kanału, reagują na różne sygnały, zmiany stężenia jonów wapnia, zmiany potencjału elektrycznego na błonie lub związanie cząsteczki sygnałowej. W ten sposób kanały jonowe mogą odpowiadać na zróżnicowane bodźce środowiskowe.

⁴Dodatkowe informacje na temat kanałów jonowych i procesów transportu jonów przez błony biologiczne można znaleźć między innymi w następujących opracowaniach polskojęzycznych: DOŁOWY K., SZEWCZYK A., PIKUŁA S., 2003. *Błony biologiczne*. Wydawnictwo Naukowe Śląsk, Katowice, str. 273; PIKUŁA S., 1997. *ATPaza transportująca jony wapnia z błon sarkoplazmatycznego retikulum*. Kosmos 46, 105–114; PIKUŁA S., 1997. *Podwójna twarz Ca^{2+} -ATPazy*. Kosmos 46, 507–514.



Ryc. 2. „Filtr selektywności” kanału transportującego jony potasu.

Dlaczego w przypadku kanału potasowego, przez kanał transportowane są przede wszystkim jony potasu, a nie jony sodu? Spowodowane jest to obecnością w cząsteczce kanału „filtra selektywności”. Jony potasu, przed wejściem do kanału, są związane z cząsteczkami wody; w kompleksie tym zachowane są określone odległości pomiędzy jonem potasu a atomami tlenu w cząsteczkach wody, wynikające między innymi z charakterystycznej wielkości jonu potasu (promień atomowy wynosi 1,33 Å). W „filtrze selektywności” kanału (pokazanym schematycznie na rycinie) odległości pomiędzy atomami tlenu „filtra” a jonami potasu są idealnie takie same, jak w kompleksie jonu z cząsteczkami wody w roztworze, dlatego jony potasu mogą bez problemu „przenikać” przez kanał. Jony sodu są mniejsze (promień atomowy wynosi 0,95 Å), nie pasują do układu atomów tlenu w „filtrze”, dlatego z ponad 1000-krotnie mniejszym prawdopodobieństwem niż jony potasu przenikają przez kanał. Ten sam mechanizm zapobiegawczy dotyczy innych jonów obecnych w środowisku. Rycinę opracowano m.in. na podstawie informacji zawartych na stronie internetowej Muzeum Nagrody Nobla (Press Release: The Nobel Prize in Chemistry 2003).

ZNACZENIE BADAŃ KANAŁÓW TRANSPORTUJĄCYCH CZĄSTECZKI WODY I JONY W MEDYCYNIE

Ocena wagi odkrycia naukowego w dziedzinie badań podstawowych wymaga czasu, który musi upłynąć nie tylko do momentu potwierdzenia uzyskanych wyników przez niezależnych badaczy, ale także do znalezienia jego zastosowań w naszym codziennym życiu. Fundamentalne znaczenie akwaporyn i kanałów jonowych w funkcjonowaniu komórek, tkanek i całego organizmu jest jednak trudno przecenić. Komitet Nagrody Nobla podjął decyzję stosunkowo szybko od momentu odkrycia akwaporyn i określania mechanizmu transportu jonów przez kanały potasowe i chlorkowe. Ciekawym jest, że Roderick MacKinnon, rozpoczął swoją karierę zawodową na polu medycyny (uzyskał tytuł doktora medycyny w 1982 r.), wiążąc swój los z nauką dopiero po trzydziestce; w wieku 47 lat otrzymał Nagrodę Nobla. Peter Agre uzyskał tytuł doktora medycyny w 1976 r. Niemal pewne jest, że ze względu na wykształcenie medyczne obu badaczy, ich badania mają tak wiele wspólnego z medycyną.

Akwaporyny odkryto w komórkach wszystkich badanych pod tym względem organizmów, od bakterii, poprzez rośliny, do człowieka. W organizmie człowieka akwapory-

ny odgrywają ważną rolę we wszystkich organach i tkankach (zidentyfikowano co najmniej 11 izoform kanału transportującego cząsteczki wody), jednak szczególnie spektakularny jest przykład nerek. W kłębuszkach nerkowych, pełniących funkcję „molekularnego sita”, woda, jony i związki niskocząsteczkowe są usuwane z organizmu w postaci pierwotnego moczu (w ciągu doby produkowane jest około 170 litrów). Jednak dla zachowania właściwej gospodarki wodnej organizmu, większość wody jest resorbowana do krwi w wyniku działania akwaporyn AQP1 (70%) i AQP2 (10%), występujących w błonach nabłonka wyściełającego moczowody. To dzięki działaniu akwaporyn ostatecznie wydalamy na dobę tylko około jednego litra moczu. Resorpcji ulegają również niezbędne dla zachowania równowagi jonowej organizmu jony: K^+ , Na^+ i Cl^- . Wykazano, że wazopresyna (hormon antydiuretyczny) stymuluje transport AQP2 do błon komórek wyściełających moczowody, wpływając w ten sposób na wzrost resorpcji wody w moczowodach. U osób z niedoborem wazopresyny może rozwinąć się choroba (łac. *diabetes insipidus*) charakteryzującą się dziennym wydalaniem 10–15 litrów moczu i

drastycznymi zaburzeniami gospodarki wodnej organizmu.

Przytoczony przykład stanowi doskonałą ilustrację tezy, że poznanie funkcjonowania akwaporyn na poziomie molekularnym może stanowić źródło niezbędnej wiedzy pozwalającej skutecznie zwalczać stany chorobowe związane z gospodarką wodną organizmu i ochroną przed przegrzaniem (tak jak w przypadku katastrofalnych fali gorąca, które dotknęły Europę w początkach XXI w.). Coraz częściej też identyfikowane są stany chorobowe wynikające z niedoboru lub nieprawidłowego funkcjonowania akwaporyn w organizmie.

Gospodarka wodna organizmu jest nieodłącznie związana z równowagą jonową, zarówno płynów ustrojowych, jak i każdej komórki ciała. Właściwe funkcjonowanie kanałów jonowych leży u podstaw normalnego funkcjonowania komórek, tkanek i organów. Katalizując szybki i selektywny przepływ jonów nieorganicznych (K^+ , Na^+ , Cl^- , Ca^{2+}) przez błony komórek, kanały te przyczyniają się do powstawania sygnałów elektrycznych odgrywających rolę w skurczu mięśnia sercowego, w wydzielaniu hormonów oraz w procesach za-

pamiętywania i przekazywania informacji w układzie nerwowym.

Zaburzenia funkcji tych kanałów prowadzą nieodwołnie do rozwoju bardzo poważnych schorzeń układu nerwowego (np. zaburzeń wydzielania neuroprzekaźników), problemów z lokomocją (zaburzenia cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśni, uszkodzenia układu mięśniowego), niewłaściwej pracy mięśnia sercowego (zaburzenia homeostazy wapniowej w mięśniu sercowym) oraz zaburzeń pracy innych organów i układów (w tym układu kostnego). Dlatego kanały jonowe są uznawane za jeden z najważniejszych celów interwencji farmakologicznych zmierzających do niesienia ulgi cierpiącym na choroby związane z zaburzeniami równowagi jonowej organizmu. W celu właściwego zaprojektowania odpowiedniego aktywnego biologicznie związku, charakteryzującego się właściwością regulowania przepuszczalności określonego typu kanałów jonowych, badania podstawowe zmierzające do wyjaśnienia struktury i funkcji tych systemów transportu jonów w komórce są warunkiem *sine qua non* zastosowania związku w praktyce klinicznej i skuteczności podjętego leczenia farmakologicznego.

SEA WATER AND HOLES IN MEMBRANES – NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY FOR 2003

S u m m a r y

The Nobel Prize in Chemistry for 2003 was awarded by the Royal Swedish Academy of Sciences in equal parts to two American scientists: Peter Agre from Johns Hopkins University School of Medicine in Baltimore, for the discovery of the water channels, aquaporins, and Roderick MacKinnon from Howard Hughes Medical Institute, the Rockefeller University

in New York, for structural and mechanistic studies of the ion channels, especially the potassium and chloride channels. The major breakthrough made by the two scientists in our understanding of water and ion transport processes through biological membranes are briefly described in this editorial note, and the list of their recent selected publications is provided.

WYBRANE PUBLIKACJE PETERA AGRE I RODERICKA MACKINNONA W LATACH 1999–2004 NA TEMAT AKWAPORYN I KANAŁÓW JONOWYCH

AGRE P., KING L. S., YASUI M., GUGGINO W. B., OTTERSEN O. P., FUJIYOSHI Y., ENGEL A., NIELSEN S., 2004. *Aquaporin water channels – from atomic structure to clinical medicine*. J. Physiol. 542, 3–16.

AGRE P., KOZONO D., 2003. *Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases*. FEBS Lett. 555, 72–78.

AMIRY-MOGHADDAM M., WILLIAMSON A., PALOMBA M., EID T., DE LANEROLLE N. C., NAGELHUS E. A., ADAMS M. E., FROEHNER S. C., AGRE P., OTTERSEN O. P., 2003. *Delayed K^+ clearance associated with aquaporin-4 mislocalization: phenotypic defects in brains of -syntrophin-null mice*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 13615–13620.

AMIRY-MOGHADDAM M., XUE R., HAUG F. M., NEELY J. D., BHARDWAJ A., AGRE P., ADAMS M. E., FROEHNER S. C., MORI S., OTTERSEN O. P., 2004. *-Syntrophin deletion removes the perivascular but not endothelial pool of aquaporin-4 at the blood-brain barrier and delays the development of brain edema in an experimental model of acute hyponatremia*. FASEB J. 18, 542–544.

BEITZ E., PAVLOVIC-DJURANOVIC S., YASUI M., AGRE P., SCHULTZ J. E., 2004. *Molecular dissection of water and glycerol permeability of the aquaglyceroporin from Plasmodium falciparum by mutational analysis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 1153–1158.

- BORGNIA M. J., AGRE P., 2001. *Reconstitution and functional comparison of purified GlpF and AqpZ, the glycerol and water channels from Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 2888–2893.
- CARBREY J. M., BONHIVERS M., BOEKE J. D., AGRE P., 2001. *Aquaporins in Saccharomyces: characterization of a second functional water channel protein*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 1000–1005.
- DUTZLER R., CAMPBELL E. B., CADENE M., CHAIT B. T., MACKINNON R., 2002. *X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity*. Nature 415, 287–294.
- DUTZLER R., CAMPBELL E. B., MACKINNON R., 2003. *Gating the selectivity filter in ClC chloride channels*. Science 300, 108–112.
- FUJIIYOSHI Y., MITSUOKA K., DE GROOT B. L., PHILIPPSSEN A., GRUBMULLER H., AGRE P., ENGEL A., 2002. *Structure and function of water channels*. Curr. Opin. Struct. Biol. 12, 509–515.
- JIANG Y., LEE A., CHEN J., CADENE M., CHAIT B. T., MACKINNON R., 2002. *Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel*. Nature 417, 515–522.
- JIANG Y., LEE A., CHEN J., CADENE M., CHAIT B. T., MACKINNON R., 2002. *The open pore conformation of potassium channels*. Nature 417, 523–526.
- JIANG Y., LEE A., CHEN J. Y., RUTA V., CADENE M., CHAIT B. T., MACKINNON R., 2003. *X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel*. Nature 423, 33–41.
- JIANG Y., RUTA V., CHEN J. Y., LEE A., MACKINNON R., 2003. *The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel*. Nature 423, 42–48.
- JIANG Q. X., WANG D. N., MACKINNON R., 2004. *Electron microscopic analysis of KvAP voltage-dependent K⁺ channels in an open conformation*. Nature 430, 806–810.
- KING L. S., CHOI M., FERNANDEZ P. C., CARTRON J.-P., AGRE P., 2001. *Defective urinary-concentrating ability due to a complete deficiency of aquaporin-1*. N. Engl. J. Med. 345, 175–179.
- KING L. S., NIELSEN S., AGRE P., BROWN R. H., 2002. *Decreased pulmonary vascular permeability in aquaporin-1-null humans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 1059–1063.
- KOZONO D., YASUI M., KING L. S., AGRE P., 2002. *Aquaporin water channels: atomic structure and molecular dynamics meet clinical medicine*. J. Clin. Invest. 109, 1395–1399.
- LEE S. Y., MACKINNON R., 2004. *A membrane-access mechanism of ion channel inhibition by voltage sensor toxins from spider venom*. Nature 430, 232–235.
- MACKINNON R., 2003. *Potassium channels*. FEBS Lett. 555, 62–65.
- MORAIS-CABRAL J. H., ZHOU Y., MACKINNON R., 2001. *Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter*. Nature 414, 37–47.
- MURATA K., MITSUOKA K., HIRAI T., WALZ T., AGRE P., HEYMANN J. B., ENGEL A., FUJIIYOSHI Y., 2000. *Structural determinants of water permeation through aquaporin-1*. Nature 407, 599–605.
- NEELY J. D., AMIRY-MOGHADAM M., OTTERSEN O. P., FROEHNER S. C., AGRE P., ADAMS M. E., 2001. *Syntrophin-dependent expression and localization of aquaporin-4 water channel protein*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 14108–14113.
- NIELSEN S., FROKIAER J., MARPLES D., KWON T. H., AGRE P., KNEPPER M. A., 2002. *Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine*. Physiol. Rev. 82, 205–244.
- NISHIDA M., MACKINNON R., 2002. *Structural basis of inward rectification: cytoplasmic pore of the G protein-gated inward rectifier GIRK1 at 1.8 Å resolution*. Cell 111, 957–965.
- RUTA V., JIANG Y., LEE A., CHEN J. Y., MACKINNON R., 2003. *Functional analysis of an archaebacterial voltage-dependent K⁺ channel*. Nature 422, 180–185.
- TSUBOTA K., HIRAI S. I., KING L. S., AGRE P., ISHIDA N., 2001. *Defective cellular trafficking of lacrimal gland aquaporin-5 in Sjögren's syndrome*. Lancet 357, 688–689.
- VALIYAVEETIL F. I., ZHOU Y. F., MACKINNON R., 2002. *Lipids in the structure, folding, and function of the KcsA K⁺ channel*. Biochemistry 41, 10771–10777.
- YASUI M., HAZAMA A., KWON T. H., NIELSEN S., GUGGINO W. B., AGRE P., 1999. *Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin*. Nature 402, 184–187.
- YIFRACH O., MACKINNON R., 2002. *Energetics of pore opening in a voltage-gated K⁺ channel*. Cell 111, 231–239.
- ZHOU M., MACKINNON R., 2004. *A mutant KcsA K⁺ channel with altered conduction properties and selectivity filter ion distribution*. J. Mol. Biol. 338, 839–846.
- ZHOU Y., MACKINNON R., 2004. *Ion binding affinity in the cavity of the KcsA potassium channel*. Biochemistry 43, 4978–4982.