

AKTUALNY STAN WIEDZY O AKWAPORYNACH BEZKRĘGOWCÓW ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM AKWAPORYN OWADZICH

THE CURRENT KNOWLEDGE OF INVERTEBRATE AQUAPORIN
WATER CHANNELS WITH PARTICULAR EMPHASIS ON INSECT AQPS

Ewa TOMKOWIAK, Joanna Romana PIENKOWSKA

Zakład Biologii Komórki; Wydział Biologii; Uniwersytet im. Adama Mickiewicza,
Poznań

Streszczenie: Akwaporyny (AQP) są jednymi z najpowszechniej występujących białek integralnych błony komórkowej obecnych we wszystkich żywych organizmach. Obecność budowanych przez nie kanałów wodnych w fosfolipidowej dwuwarstwowej błonie komórkowej znacznie zwiększa jej przepuszczalność dla cząsteczek wody oraz w pewnych przypadkach także dla innych małych związków chemicznych. Wszystkie zidentyfikowane dotychczas akwaporyny charakteryzują się tą samą strukturą, dla której typowa jest obecność sześciu domen transbłonowych oraz dwóch motywów konserwatywnych wyścielających por. W zależności od transportowanej substancji, akwaporyny można podzielić na dwie główne klasy: akwaporyny (budują kanały przepuszczalne tylko dla wody) i akwagliceroporyny (kanały przepuszczalne również dla glicerolu i/lub innych związków). W jednym organizmie istnieje wiele różnych akwaporyn równocześnie. Wykazano, iż ich lokalizacja jest tkankowo specyficzna. Większość scharakteryzowanych dotychczas kanałów wodnych bezkręgowców to białka owadzie. Tak więc i cała wiedza na temat akwaporyn u bezkręgowców zasadniczo sprowadza się do informacji na temat kanałów wodnych u tej grupy zwierząt. Zwierzęta te charakteryzują się zadziwiającą różnorodnością przystosowań fizjologicznych, widocznych zwłaszcza na przykładzie strategii odżywiania się czy też sposobów przetrwania w nieprzyjnym środowisku. Przykładem tych adaptacji może być m.in. żywienie się dużymi objętościami płynów (np. krwią), czy też tolerowanie ekstremalnego zimna lub suszy. Wydaje się być oczywiste, że wiele tego typu przystosowań powstało dzięki ekspresji i regulacji odpowiednich akwaporyn. W niniejszej pracy przeglądowej zaprezentowano obecny stan wiedzy dotyczący akwaporyn zlokalizowanych u bezkręgowców (owadów i nicieni) oraz porównanie ich budowy i funkcji z najlepiej dotąd zbadanymi akwaporynami ssaczymi.

Słowa kluczowe: kanał wodny, akwaporyna, błona komórkowa, woda, bezkręgowce.

Summary: Aquaporins (AQPs) or water channels are some of the most ubiquitous integral membrane proteins that are present in all living organisms. Their presence in the lipid bilayer of cell membranes considerably increases their permeability to water and, in some cases, to other small solutes. All identified AQPs share the same structure, with the presence of six transmembrane segments and two conservative regions forming the pore. Depending on the transported solutes, AQPs can be divided into two classes:

'classical' aquaporins (permeable only to water) and aquaglyceroporins (permeable also to glycerol and/or other solutes). Many subtypes of AQP coexist in a single organism. Localization of particular subtypes of AQPs is tissue-specific. AQPs have been well characterized in almost all vertebrate classes. However, little is known about their counterparts in invertebrates. Most of the characterised water channels in invertebrates are found in insects. Therefore, the full knowledge of aquaporins in invertebrates is generally nothing but the information concerning water channels in these class of organisms. Insects are characterised by astonishing variety of physiological adaptations, noticeable especially in their feeding strategy or survival strategies in hostile environments. The example of such is feeding on blood or tolerating extreme cold or drought. It seems obvious that many of these adaptation patterns emerged due to the expression and regulation of particular aquaporins. Here we review the current state of knowledge of invertebrate AQPs (insects and nematode AQPs) and compare their structure and function with mammalian water channels.

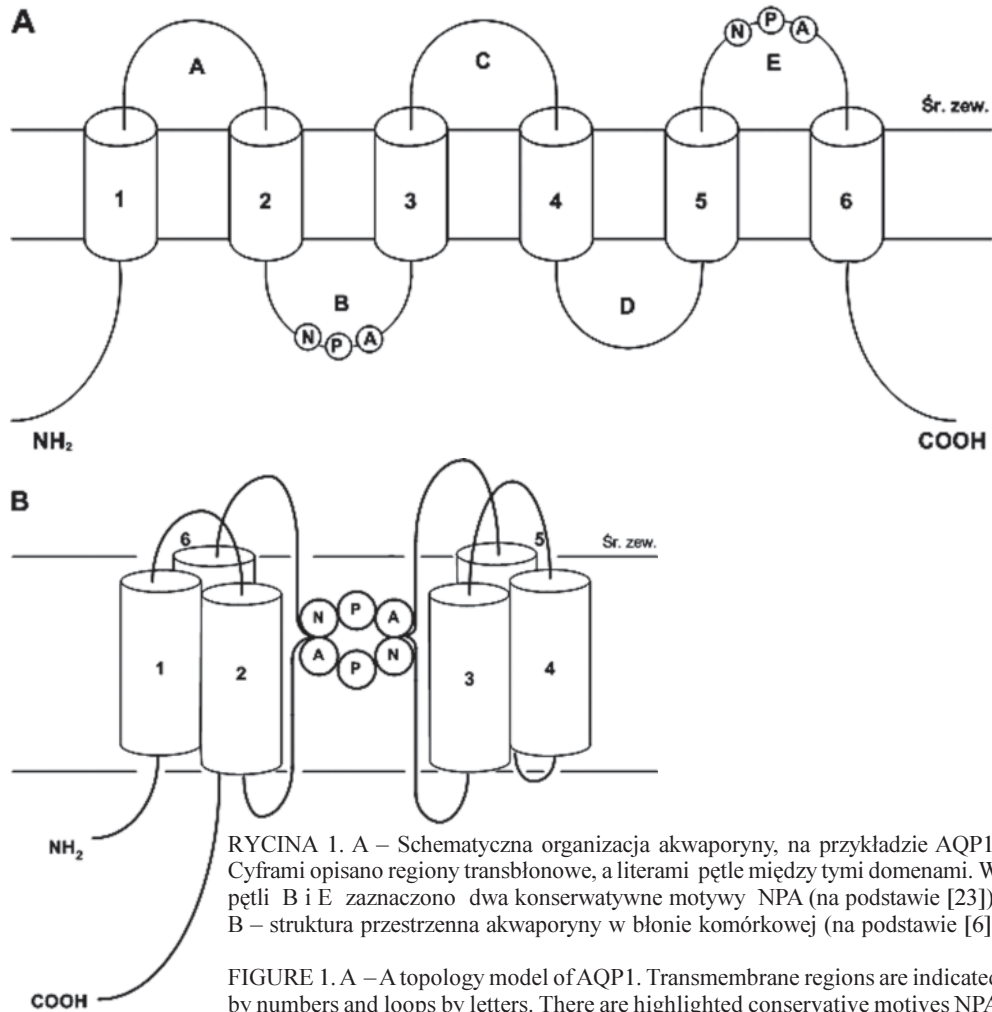
Key words: water channel, aquaporin, cell membrane, water, invertebrates.

Wykaz skrótów: **AQP** – akwaporyna; **cAMP** – cykliczny adenozyńomofosforan; **DH** – hormon diuretyczny; **kDa** – kilodaltony; **MIP** – rodzina integralnych białek błonowych; **NPA** – konserwatywny motyw aminokwasowy (Asn-Pro-Ala); **NPT** – motyw aminokwasowy (Asn-Pro-Thr); **NPV** – motyw aminokwasowy (Asn-Pro-Val); **nt** – nukleotydy; **OAP** – wzory romboidalne tworzone przez skupiska akwaporyn w błonie komórkowej.

1. WSTĘP

W 1992 r. Agre [1] po raz pierwszy opisał białko budujące w błonach erytrocytów kanały przepuszczające wodę. Wkrótce potem się okazało, że białko to – nazwane akwaporyną (AQP) – występuje powszechnie w świecie roślin [14] i zwierząt [29, 10], a także w komórkach bakterii [11], grzybów [30] i pierwotniaków [4]. To powszechne występowanie akwaporyn może być traktowane jako dowód niezmiernie ważnej roli, jaką pełnią. Ze względu na transportowane substancje kanały wodne dzieli się na dwie duże grupy: przewodzące tylko wodę, budowane przez akwaporyny, oraz kanały, które poza wodą transportują również inne substancje, np. glicerol i mocznik, budowane przez akwagliceroporyny [23]. Oba typy białek charakteryzują się podobną strukturą [31]. Białka zaliczane do białek integralnych błony komórkowej (MIP) funkcjonują w niej w postaci homotetramerów. Akwaporyna jest pojedynczym łańcuchem polipeptydowym o masie ok. 30 kDa, w skład którego wchodzi sześć domen transbłonowych o budowie α -helisy. Domeny połączone są pięcioma pętlami, z których trzy są zewnątrzkomórkowe (A, C, E) i dwie wewnątrzkomórkowe (B i D). N- i C-koniec polipeptydu znajdują się po stronie cytoplazmatycznej. Pętla B i E zawierają po jednym motywie NPA (Asn-Pro-Ala), które oddziałując ze sobą tworzą wewnątrz błony por wodny (ryc. 1). Reszty aminokwasowe zlokalizowane w pobliżu poru są odpowiedzialne za selektywność transportu [23]. Cztery monomery budują kanał wodny zawierający cztery pory wodne [6] (ryc. 2).

U człowieka wykryto dotychczas 13 rodzajów kanałów wodnych budowanych przez akwaporyny AQP0 do AQP12 i określono ich występowanie w różnych narządach [22]. Ponadto wykazano, że ekspresja genów kodujących białka dla różnego rodzaju kanałów wodnych jest tkankowo specyficzna [34], stąd prawdopodobnie tak duża ilość różnych akwaporyn zidentyfikowanych w jednym i tym samym organizmie. Akwaporyny 0, 1, 2, 4, 5, 6 i 8 budują typowe kanały transportujące wodę, natomiast

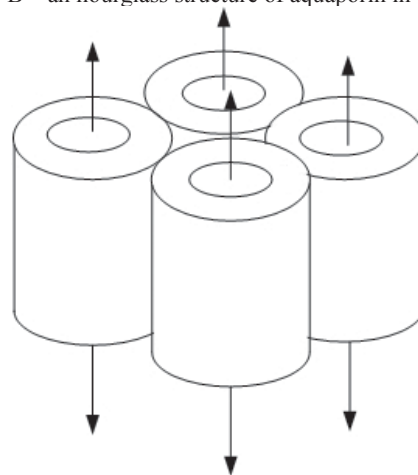


RYCINA 1. A – Schematyczna organizacja akwaporyny, na przykładzie AQP1. Cyframi opisano regiony transbłonowe, a literami pętle między tymi domenami. W pętli B i E zaznaczono dwa konserwatywne motywy NPA (na podstawie [23]); B – struktura przestrzenna akwaporyny w błonie komórkowej (na podstawie [6])

FIGURE 1. A – A topology model of AQP1. Transmembrane regions are indicated by numbers and loops by letters. There are highlighted conservative motives NPA in loops B and E (based on [23]); B – an hourglass structure of aquaporin in the bilayer (based on [6])

RYCINA 2. Struktura tetramery tworzącego funkcjonalny kanał wodny. Każdy monomer ma indywidualny por wodny zaznaczony strzałkami (na podstawie [6])

FIGURE 2. Tetrameric assembly of AQP1 in a membrane in which individual monomers contain water pores (based on [6])



akwaporyny 3, 7, 9 i 10 są akwagliceroporynami. Akwaporyny 11 i 12 są dotychczas najmniej poznane i zakwalifikowanie ich do odpowiedniej grupy jest na razie niemożliwe [22]. Ostatnie badania donoszą, że niektóre akwaporyny mają również zdolność transportowania innych, pozbawionych ładunku związków, takich jak: CO_2 , H_2O_2 , NO , NO_2 i NH_3 [32]. Jednak wpływ tego transportu na prawidłowe funkcjonowanie komórek i tkanek nie jest jeszcze dokładnie określony [32].

Scharakteryzowano już akwaporyny budujące kanały wodne w tkankach i narządach przedstawicieli niemal wszystkich gromad kręgowców [21, 25, 28]. Wszystkie cechuje podobna budowa, chociaż ich funkcja może być różna, charakterystyczna dla poszczególnych zwierząt. Nasza wiedza na temat kanałów wodnych u bezkręgowców jest dużo mniejsza. Dotychczas scharakteryzowano akwaporyny tylko u nielicznych przedstawicieli owadów i nicieni.

2. AKWAPORYNY OWADZIE

Wśród gatunków owadów zbadanych pod kątem akwaporyn udało się dotychczas zidentyfikować tylko po jednym białku budującym kanały wodne. Jedynie u muszki owocowej *Drosophila melanogaster* zidentyfikowano więcej niż jedną akwaporynę.

2.1. Akwaporyna komara *Aedes aegypti*

Jedyny dotychczas odkryty gen akwaporyny u komara *Aedes aegypti* ulega ekspresji w układzie oddechowym. Lokalizacja ta jest związana z fizjologią układu tchawkowego, w którym bardzo ważną rolę odgrywa regulacja objętości płynu w tracheolach, najcieńszych odgałęzieniach tchawek wnikających pomiędzy komórki poszczególnych narządów. W zależności od aktywności metabolicznej danego narządu, ilość płynu w tracheolach jest zmienna. Dzięki temu możliwa jest regulacja tempa dyfuzji tlenu z tchawek do komórek. Podczas dużego zapotrzebowania energetycznego płyn zostaje wycofany z tracheoli, a tlen może szybciej dyfundować z układu oddechowego. Odwrotna sytuacja ma miejsce podczas odpoczynku – płyn wypełnia wtedy tracheole w znacznej ich części, a dyfuzja tlenu poprzez płyn do komórek docelowych jest wolniejsza. Akwaporynę obecną w komórkach budujących tracheole komara nazwano *AeaAQP* [24]. Kanał wodny budowany przez tę akwaporynę bierze udział w regulacji stopnia uwodnienia tych komórek, jak i stopnia wypełnienia płynem tracheoli [24]. Co charakterystyczne, obecność akwaporyny została stwierdzona jedynie w komórkach tracheolarnych, w których sąsiedztwie przebiegają cewki Malpighiego. Transkrypt genu tego białka występuje również w komórkach jelita tylnego odpowiedzialnych za wymianę gazową, jednak samego kanału wodnego nie udało się tam zlokalizować. Poza komórkami tracheolarnymi, w innych komórkach układu oddechowego komara nie zlokalizowano ani akwaporyn, ani transkryptów ich genów. Podsumowując wydaje się zatem, że funkcją kanału wodnego budowanego przez *AeaAQP*, obecnego w części układu oddechowego

komara, jest regulacja objętości wody w komórkach tracheolarnych zaopatrujących komórki cewek Malpighiego w tlen [5, 7].

W celu dokładnego scharakteryzowania właściwości kanału wodnego przeprowadzono ekspresję budującej go *AeaAQP* w oocycie *Xenopus laevis* [7]. Wykazano, że tempo transportu wody przez błonę komórkową, w obecności akwaporyny, wzrosło dziesięciokrotnie. Przepływ ten jest blokowany przez jony rtęci. Nie stwierdzono, by kanał był zdolny transportować glicerol, mocznik lub inne niskocząsteczkowe związki. Ekspresja *AeaAQP* w oocycie pozwoliła natomiast zaobserwować, że białko to tworzy w błonie komórkowej wzory romboidalne zwane w języku angielskim *orthogonal array* (OAP). Odległość pomiędzy poszczególnymi cząsteczkami wchodzącymi w skład OAP wynosi 6,8–6,9 nm i jest to wartość porównywalna do OAP tworzonych przez akwaporyny innych organizmów. Poza obrębem tych struktur nie stwierdzono obecności akwaporyn w błonie komórkowej [7].

AeaAQP jest białkiem składającym się z 249 aminokwasów, o masie cząsteczkowej 26,1 kDa [24]. Porównując sekwencję aminokwasową *AeaAQP* z innymi sekwencjami dobrze już zbadanych białek kanałów wodnych u innych organizmów można wnioskować o kilku cechach *AeaAQP*. Jedną z nich jest, jak to wspomniano wyżej, wrażliwość na jony rtęci, które blokują przepływ wody przez kanał. Odpowiedzialna za wiązanie jonów rtęci, a tym samym za blokowanie transportu wody, jest prawdopodobnie cysteina w pozycji 79, występująca w pobliżu motywu NPA w pętli B (ryc. 3). Na podstawie sekwencji aminokwasowej można również wnioskować, że białko to nie ma żadnego miejsca fosforylacji, co oznacza, że jest niezależne od działania kinaz (brak sekwencji Arg-Arg-X-Ser). Występuje w nim natomiast potencjalne miejsce glikozylacji w pętli E (Asn211-Trp212-Thr213) [24].

2.2. Akwaporyna pluskwiaka *Rhodnius prolixus*

Rhodnius prolixus jest przedstawicielem pluskwiaków różnoskrzydłych (*Heteroptera*), a więc owadów, które okresowo przyjmują pokarm o objętości wielokrotnie większej od objętości ich ciała. Pluskwiak musi więc, w stosunkowo szybkim czasie, wydaląć część przyjętego z pokarmem płynu. Proces ten odbywa się w czasie 10–15 minut po przyjęciu pokarmu i rozpoczyna się od wydzielania hormonu diuretycznego (DH) przez komórki zwojów nerwowych podrażnione w wyniku zwiększonej objętości odwłoka. Działając na cewki Malpighiego DH indukuje wydalanie nadmiaru płynu. Obserwacje te nasunęły przypuszczenia, że w komórkach cewek Malpighiego występują białka, które mogą być zaliczone do rodziny akwaporyn. Przeprowadzone badania potwierdziły obecność akwaporyny w tych komórkach. Wyizolowane białko nazwano Rp-MIP [8], od nazwy gatunkowej owada i grupy białek, do których należą akwaporyny.

W celu oceny zdolności kanału wodnego utworzonego przez Rp-MIP do transportu wody przeprowadzono także jego ekspresję w oocycie *X. laevis* [8]. W porównaniu z oocytym kontrolnym szybkość transportu wody w oocycie z wbudowanym Rp-MIP wzrosła dwukrotnie. Trzeba zaznaczyć, że w porównaniu z innymi akwaporynami jest to wzrost stosunkowo mały. Dodatkowo sprawdzono również wpływ jonów rtęci na funkcjonowanie tego białka. Obecność $HgCl_2$ nie zahamowała przepływu wody przez

kanał, co oznacza, że jest on niewrażliwy na działanie jonów rtęci, mimo posiadania dziewięciu cystein, które potencjalnie mogłyby te jony wiązać (ryc. 3).

Na podstawie struktury genu *Rp-MIP* można wnioskować, że będące jego produktem białko Rp-MIP składa się z 286 aminokwasów o masie ok. 31 kDa. W białku tym zarówno N-, jak i C-koniec zlokalizowane są w cytoplazmie, a w błonie komórkowej łańcuch tworzy sześć domen transbłonowych, co jest typowe dla wszystkich akwaporyn. Cechą odróżniającą Rp-MIP od innych akwaporyn jest obecność motywu NPV (Asn-Pro-Val) w pętli E w miejscu typowo występującego motywu NPA (Asn-Pro-Ala). Na podstawie sekwencji aminokwasowej można wnioskować, że Ser11 jest miejscem fosforylacji dla kinazy zależnej od cAMP (kinaza A). Potencjalnie również Ser25 i Ser262 mogą być miejscem fosforylacji dla innej kinazy zależnej od Ca^{2+} i kalmoduliny – kinaza CaM, a zlokalizowana w pozycji 248 asparagina jest potencjalnym miejscem N-glikozylacji [8].

2.3. Akwaporyna pluskwiaka *Cicadella viridis*

Poszukiwanie akwaporyn u *Cicadella viridis*, reprezentującej pluskwiaki równo-skrzydłe (*Homoptera*), rozpoczęto od komory filtracyjnej [18]. Jest to struktura zlokalizowana w przewodzie pokarmowym, zbudowana z wysoce wyspecjalizowanego nabłonka, odpowiedzialna za szybki transport wody z przedniej części jelita środkowego do jego części dystalnej lub do cewek Malpighiego. Z komórek nabłonka komory filtracyjnej wyizolowano mRNA, kodujące akwaporynę składającą się z 255 aminokwasów o masie cząsteczkowej 26 kDa. Białko to nazwano AQP_{cic}. Zbadanie wpływu kanału wodnego budowanego przez AQP_{cic} na transport wody i glicerolu było możliwe poprzez przeprowadzenie ekspresji białka AQP_{cic} w oocycie *X. laevis* [18]. Szybkość transportu wody w oocycie z wbudowanym AQP_{cic} była ponad piętnastokrotnie większa w porównaniu z oocytem kontrolnym. Efekt utrzymywał się przez 1 do 4 dni po iniekcji. Jednocześnie nie zaobserwowano wzrostu szybkości transportu glicerolu. Wykazano również hamujące działanie jonów rtęci na transport przez AQP_{cic}, ale dopiero przy stosunkowo wysokim stężeniu tych jonów. Jest to zapewne spowodowane specyficzną lokalizacją cystein w łańcuchu białkowym tej akwaporyny. W kanale wodnym *C. viridis* nie zidentyfikowano cysteiny w pętli E, która jest zazwyczaj odpowiedzialna za hamujący wpływ Hg^{2+} . Jedyne Cys82 oraz Cys90, zlokalizowane blisko motywu NPA w pętli B oraz Cys134 w pętli C, wydają się być potencjalnymi miejscami wiązania jonów rtęci. Ponieważ są one umiejscowione blisko domen transbłonowych, dostęp Hg^{2+} do nich jest utrudniony. Prawdopodobnie dlatego potrzebne jest większe stężenie jonów do zahamowania transportu (ryc. 3) [18].

2.4. Akwaporyny muszki owocowej *Drosophila melanogaster*

W genomie *Drosophila melanogaster* zidentyfikowano sześć genów kodujących białka tworzące kanały wodne. Białka kodowane przez te geny nazwano: DRIP, Aqp4019, Aqp17664, Aqp7777, Aqp17662 i Aqp5398 [15]. Cztery pierwsze występują

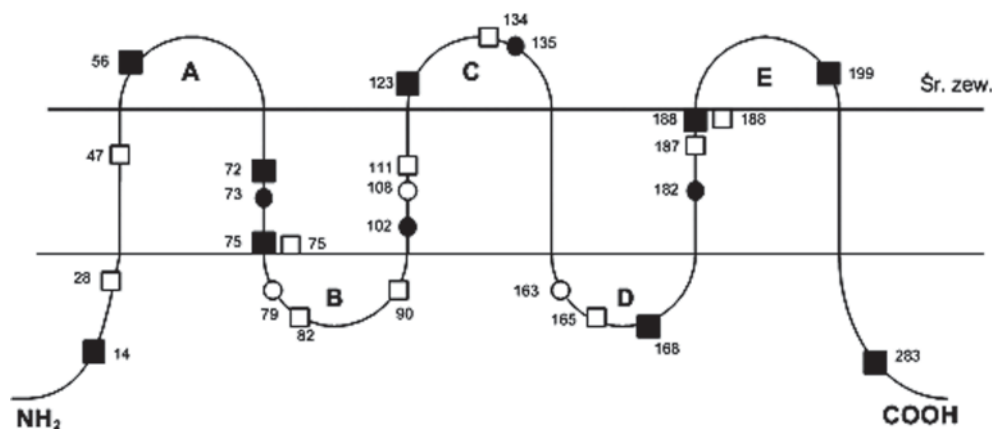
zarówno w stadium embrionalnym, jak i u imago. W przypadku Aqp17662 oraz Aqp5398 nie udało się ustalić miejsca ich ekspresji.

W stadium embrionalnym *D. melanogaster* Aqp7777 jest głównie obecna w związkach mózgu i zwojach nerwowych, Aqp17664 w gruczołach wydzielniczych i w części jelita, a Aqp4019 występuje głównie w ścianach ciała i w mięśniach trzewnych. Natomiast ekspresja DRIP zachodzi w wielu narządach podczas całego rozwoju muszki. Białko to można zlokalizować od wczesnego stadium, już w blastodermie, co wskazuje na to, że transkrypt tego białka jest już obecny w oocycie. Oznacza to, że wcześniej pojawiające się białko DRIP jest pochodzenia matczynego. W dalszym etapie rozwoju budowany przez nie kanał wodny obecny jest w związku jelita środkowego i tylnego, a następnie pojawia się również w gardzieli oraz na granicy jelita przedniego i środkowego. W końcowych stadiach rozwoju muszki owocowej DRIP pojawia się w komórkach wokół tylnych przetchlinek. Obecność akwaporyn już w zarodkach owada wskazuje na istotną rolę, jaką będą odgrywać w dalszym życiu owada. W różnych odcinkach jelita rola ta może być zróżnicowana: w jelicie przednim wspierać może wydzielanie wody dla zwilżania pokarmu, w jelicie środkowym ułatwiać wchłanianie pokarmu, a w jelicie tylnym – reabsorpcję wody [15]. Obecność akwaporyn przy tylnych przetchlinkach sugeruje, iż kanały wodne, które one budują, biorą udział w regulacji stopnia otwarcia przetchlinek, a przez to w regulacji parowania wody z układu tchawkowego [15].

U imago *D. melanogaster* akwaporyny zlokalizowano ponadto w takich narządach jak cewki Malpighiego oraz jelito [15]. Rozpuszczone w wodzie sole kwasu moczowego transportowane są z cewek do jelita. W jelicie tylnym woda jest odzyskiwana i wtórnie transportowana do jamy ciała, a kryształki kwasu moczowego są wydalane na zewnątrz. Transport wody z jamy ciała do cewek Malpighiego oraz z jelita tylnego do jamy ciała odbywa się przy udziale kanałów wodnych.

Innymi akwaporynami, poza DRIP, których lokalizację u imago udało się ustalić, są Aqp4019 i Aqp17664. Występują one wraz z DRIP w cewkach Malpighiego, jednak w przeciwieństwie do niego nie występują w komórkach nabłonkowych cewek, lecz w ich komórkach głównych.

Dotychczas w oocycie *X. laevis* przeprowadzono jedynie ekspresję białka DRIP [15]. Zbadano wpływ obecności budowanego przez nie kanału wodnego na transport wody, protonów, glicerolu oraz mocznika. Z ekspresją DRIP w oocycie skorelowane było zwiększone tempo przepływu wody przez błonę komórkową. Jedną z typowych dla kanałów wodnych cechą jest brak transportu protonów, co również udowodniono w przypadku kanału budowanego przez DRIP. Brak transportu innych związków, takich jak mocznik czy glicerol, sugeruje, że białko budujące ten kanał nie należy do grupy akwagliceroporyn, lecz do grupy akwaporyn. Nie udało się natomiast doświadczalnie sprawdzić wpływu jonów rtęci na transport wody. Z lokalizacji cystein w łańcuchu białkowym można wnioskować, iż jony Hg^{2+} prawdopodobnie nie mają wpływu na funkcjonowanie tego kanału, gdyż znajdują się one w domenach transbłonowych oraz w ich pobliżu, a tym samym nie są one dostępne dla jonów rtęci (ryc. 3).



RYCINA 3. Lokalizacja cystein w łańcuchu polipeptydowym akwaporyn (na podstawie [24]):

FIGURE 3. Localization of cysteines in polypeptide chain of aquaporin (based on [24]):

O – *A.aegypti*, ■ *R. prolixus*, □ *C. viridis*, ● DRIP *D. melanogaster*

Analiza sekwencji aminokwasowej DRIP pozwala przypuszczać, że za wysoką selektywność transportu wody odpowiadają dwa niemające ładunku aminokwasy poprzedzające motyw NPA zlokalizowane w pozycji 196 i 200. Dodatkowo w pozycjach 212 i 213 w DRIP znajdują się odpowiednio tyrozyna i tryptofan. Występowanie w tych pozycjach aminokwasów aromatycznych jest typowe dla akwaporyn ssaków charakteryzujących się wysoką specyficnością w stosunku do wody. Natomiast brak w sekwencji pętli C aminokwasów odpowiedzialnych za transport glicerolu potwierdza wyniki przeprowadzonych badań świadczących o braku transportu tego związku przez kanał tworzony przez DRIP. Sekwencje te obecne są natomiast w Aqp4019(GLCVT), Aqp17664(GVCLT), Aqp17662(GVCVT) i Aqp5398(GICLV), co sugeruje, że należą do grupy akwagliceroporyn budujących kanały transportujące również glicerol [15].

Jak wszystkie białka należące do rodziny akwaporyn, również akwaporyny *D. melanogaster* zawierają sześć domen transbłonowych [15]. Jednak dwie charakterystyczne helisy częściowo zlokalizowane wewnątrz błony oraz dwa motywy NPA (Asn-Pro-Ala) nie są konserwatywne we wszystkich scharakteryzowanych akwaporynach muszki owocowej. W przypadku Aqp5398 w pętli B występuje motyw NPC (Asn-Pro-Cys), natomiast u Aqp17664 i Aqp17662 w pętli E występuje odpowiednio motyw NPV (Asn-Pro-Wal) i NPT (Asn-Pro-Thr).

3. AKWAPORYNY NICIENI

3.1. Akwaporyny *Cenorhabditis elegans*

Na podstawie sekwencji genomowego DNA można wnioskować o występowaniu jedenastu akwaporyn u nicienia *C. elegans* [12]. Osiem z nich zostało dokładniej

poznanych, są to odpowiednio: F32A5.5 (AQP-1), C01G6.1 (AQP-2), Y69E1A.7 (AQP-3), F40F9.9 (AQP-4), C35A5.1 (AQP-5), C32C4.2 (AQP-6), M02F4.8 (AQP-7) oraz K02G10.7 (AQP-8). Spośród tych białek AQP-4, AQP-5 i AQP-6 należą do akwaporyn wysoce specyficznych w stosunku do wody, podczas gdy AQP-1, AQP-2, AQP-3, AQP-7 i AQP-8 należą do akwagliceroporyn [12].

Ekspresja akwaporyn (AQP1-AQP8) w oocycie *X. laevis* ujawniła, że kanały budowane przez AQP-2, AQP-3, AQP-4, AQP-6 i AQP-7 powodują pięcio- do siedmiokrotny wzrost szybkości transportu wody w stosunku do kontroli. W przypadku AQP-4, AQP-6 i AQP-7 transport ten może być blokowany przez jony rtęci. Na przykładzie AQP-4 dokładniej zbadano podstawę tego zjawiska. Z czterech potencjalnych cystein, które mogłyby być odpowiedzialne za wiązanie jonów rtęci, tylko Cys132 okazała się być tą właściwą. Podstawienie zamiast niej tryptofanu lub treoniny spowodowało brak wrażliwości powstającego kanału na jony rtęci i przyczyniło się do spadku szybkości transportu wody. W przypadku podstawienia treoniny transport wody był tylko półtorakrotnie szybszy niż w przypadku kontroli [16]. Brak wrażliwości na jony rtęci wykazują natomiast odpowiednio AQP-2 i AQP-3.

Na podstawie analizy sekwencji aminokwasowej AQP-2 i AQP-4 stwierdzono, że mają one potencjalne miejsca fosforylacji. W przypadku AQP-2 Ser179 jest potencjalnym miejscem fosforylacji dla kinazy A, a Ser69 i Thr280 dla kinazy C. W przypadku AQP-4 występują cztery potencjalne miejsca fosforylacji dla kinazy C, którymi są odpowiednio Thr28, Thr35, Ser36, Thr235 oraz jedno miejsce fosforylacji dla kinazy A – Ser33 [16,17]. Badania prowadzone nad AQP-8 ujawniły, że białko to występuje w dwóch różnych formach. Mniejsza składa się z 258 aminokwasów, a większa – z 294. Prawdopodobnie mają one odpowiednio pięć i sześć domen transbłonowych. Podobna sytuacja ma miejsce w przypadku ssaczkiej AQP10, która również ma dwie izoformy. W przeciwieństwie jednak do tej akwaporyny, mniejsza forma akwaporyny *C. elegans* prawdopodobnie jest nieaktywna i nie tworzy funkcjonalnego kanału wodnego [20].

W celu odpowiedzi na pytanie, jaką funkcję pełnią akwaporyny u *C. elegans*, zbadano dokładnie miejsce ich ekspresji [12]. Jednym z najbardziej typowych miejsc występowania akwaporyn jest układ wydalniczy. W przypadku *C. elegans* występują tu AQP-2, AQP-3 i AQP-8. Komórki, w których zlokalizowano akwaporyny, są odpowiedzialne za resorpcję i sekrecję wody. AQP-8 występuje dodatkowo w gruczołach należących do tego układu. Natomiast AQP-2 zlokalizowana jest dodatkowo w mięśniach, neuronach ruchowych i hipodermie, która pełni również bardzo istotną rolę w utrzymaniu równowagi osmotycznej. Ekspresja AQP-3 została zaobserwowana także w przewodach i pęcherzykach nasiennych.

Kanały wodne budowane przez AQP-1 i AQP-4 biorą udział w absorpcji wody w jelicie, przy czym kanał AQP-4 występuje w błonie apikalnej, a kanał AQP-1 – w błonie bazalnej komórek nabłonkowych [12]. Ma to związek ze strategią adaptacji do stresu wodnego. W przeciwdziałaniu jego skutkom w głównej mierze bierze udział glicerol. Głównym miejscem jego syntezy są komórki jelita. W trakcie trwania stresu wodnego występujący w błonie bazalnej komórek nabłonkowych kanał

AQP-1 umożliwia transport glicerolu do płynu pseudocelomatycznego, za pośrednictwem którego może on docierać do pozostałych komórek ciała.

Ekspresja AQP-7 została zaobserwowana tylko w mięśniach [12]. Nie jest ona stała, lecz pojawia się okresowo. Pozostałe dwie akwaporyny: AQP-5 i AQP-6 występują w neuronach. Część neuronów, w których dochodzi do ekspresji AQP-5, jest połączona z neuronami wstawkowymi gardzieli. Neurony wstawkowe są odpowiedzialne za regulowanie tempa ruchów mięśni gardzieli, gdy brak jest pożywienia. Natomiast AQP-6 występuje w neuronach czuciowych, które są prawdopodobnie odpowiedzialne za zachowanie związane z poszukiwaniem pożywienia [12].

Jednak wykazano eksperymentalnie, że ekspresja akwaporyn nie jest niezbędna do utrzymania równowagi osmotycznej i prawidłowego funkcjonowania organizmu nicienia. U mutantów pozbawionych AQP-2, AQP-3, AQP-4 i AQP-8 nie zaobserwowano żadnych znaczących zmian w rozwoju, długości życia oraz żywotności. Pomimo że kanały wodne budowane przez te akwaporyny charakteryzują się najszybszym transportem wody, ich brak nie przyczynił się do istotnych zmian w funkcjonowaniu i przystosowywaniu się do stresu osmotycznego [12].

3.2. Akwaporyna glisty psiej *Toxocara canis*

Ekspresja genu akwaporyny *Tc-aqp-1* zachodzi zarówno u larw, jak i u dorosłych samców i samic glisty *T. canis*. U dojrzałych osobników mRNA kodujące tę akwaporynę zlokalizowano zarówno w głowie, hipodermie pokrywającej mięśnie, jak i w jajnikach. Pomimo zidentyfikowania tak wielu miejsc ekspresji *Tc-aqp-1* nie udało się jednak ustalić dokładnej funkcji fizjologicznej tego białka. Przypuszcza się, że bierze ono udział w tworzeniu szkieletu hydrostatycznego niezbędnego nicieniowi do poruszania się. Nie udało się również uzyskać ekspresji *Tc-aqp-1* w oocycie *X. laevis*, co uniemożliwia dokładne zbadanie tego białka. Ustalono natomiast, że cDNA *Tc-aqp-1* składa się ze 1099 nukleotydów, przy czym 21 nt z końca 5' oraz 147 nt z końca 3' nie ulega translacji. Produkt genu stanowi, więc prawdopodobnie białko o masie 34,3 kDa składające się z 310 aminokwasów. Na podstawie sekwencji łańcucha polipeptydowego można wnioskować, że tworzy on w błonie sześć domen transbłonowych oraz że w łańcuchu tym asparagina w pozycji 153 stanowi potencjalne miejsce N-glikozytacji [19].

4. PORÓWNANIE AKWAPORYN BEZKRĘGOWCÓW Z AKWAPORYNAMI SSAKÓW

Porównując nieliczne, scharakteryzowane dotąd akwaporyny budujące kanały wodne u przedstawicieli bezkręgowców z ich odpowiednikami u ssaków można zauważyć podobieństwo zarówno pełnionej funkcji, jak i budowy. Badania bioinformatyczne wykazały, iż kanały wodne zidentyfikowane u przedstawicieli bezkręgowców wykazują największe podobieństwo tylko do niektórych akwaporyn ssaków. Są podobne przede wszystkim do AQP4 i AQP1 (tab. 1).

TABELA 1. Porównanie podstawowych właściwości wybranych akwaporyn bezkręgowców
 TABLE 1. Comparison of essential features of chosen invertebrate aquaporins

Akwaporyna	Transportowana substancja	Wzrost szybkości transportu wody	Wrażliwość na Hg ²⁺	Lokalizacja	Stopień identyczności sekwencji z akwaporynami ssaków	Literatura
<i>Aea</i> AQP	Woda	10-krotny	Tak	Komórki tracheolarne	47,6% AQP4	[7, 24]
Rp-MIP		2-krotny	Nie	Cewki Malpighiego	26% AQP1	[8]
AQP <i>cic</i>		5-krotny	Tak	Komora filtracyjna	43% AQP1	[18]
DRIP		10-krotny	Nie	Jelito, przetchlinki, cewki Malpighiego	44% AQP4	[15]
AQP-2 <i>C.elegans</i>	Woda, glicerol	7-krotny	Nie	Układ wydalniczy, mięśnie, neurony ruchowe, hipoderma	44% AQP3	[12,16]

4.1. Porównanie akwaporyn bezkręgowców z akwaporyną ssaczą AQP4

Część dotychczas zbadanych akwaporyn wykazuje największe podobieństwo sekwencji aminokwasowej do AQP4 ssaków. Należą do nich akwaporyna *Aea*AQP z *A. aegypti*, której sekwencja jest identyczna z AQP4 myszy w 48% [24] oraz DRIP z *D. melanogaster*, której sekwencja jest w 44% identyczna z sekwencją AQP4 człowieka [16]. W przypadku *Aea*AQP podobieństwo nie kończy się tylko na sekwencji aminokwasowej. Lokalizacja zarówno *Aea*AQP, jak i AQP4 związana jest z układem oddechowym [24, 27]. Jednak transkrypty genów tych białek nie znajdują się wyłącznie w miejscu występowania kanału wodnego. mRNA kodujące *Aea*AQP jest wykrywalne w wielu komórkach ciała, w których samo białko akwaporyny nie zostało zlokalizowane. W przypadku gryzonia *Dipodomys merriami merriami* ma miejsce podobna sytuacja [13]. AQP4 występuje w układzie oddechowym, ale kodującą ją mRNA występuje również w nerkach.

Inną wspólną cechą akwaporyn bezkręgowców i AQP4 ssaków jest tworzenie w błonie komórkowej regularnych, prostokątnych wzorów typu OAP [26]. Zarówno *Aea*AQP, jak i AQP4 człowieka występuje w błonie tylko w obrębie tych struktur. Odległość pomiędzy poszczególnymi kanałami w OAP bezkręgowców i ssaków jest bardzo podobna i wynosi odpowiednio dla *Aea*AQP 6,7 nm i 6,8 nm dla AQP4 [7, 29].

Istotną różnicę między kanałami wodnymi budowanymi przez *Aea*AQP a kanałami AQP4 stanowi jednak odmienny wpływ jonów rtęci na transport wody. Kanał wodny zbudowany przez AQP4 u człowieka w przeciwieństwie do kanału wodnego zidentyfikowanego u komara nie jest wrażliwy na działanie Hg²⁺ [9]. Istotną różnicę stanowi również brak asparaginy w pozycji 153 *Aea*AQP, która u AQP4 jest miejscem N-glikozylacji oraz brak miejsca fosforylacji przez kinazę A, która występuje w pętli B w AQP4 [20].

Najbardziej zbliżone w swojej strukturze i funkcjonowaniu do AQP4 ssaków jest białko DRIP. Tak jak AQP4 tworzy kanał wysoce selektywny w stosunku do wody i nie przewodzi żadnej innej substancji. Transport jest bardzo szybki, gdyż kanał ten wzmaga go około dziesięciokrotnie. Białko DRIP prawdopodobnie nie jest też wrażliwe na obecność jonów rtęci, podobnie jak AQP4 [15].

4.2. Porównanie akwaporyn bezkręgowców z akwaporyną ssaczą AQP1

Badając stopień identyczności akwaporyn zidentyfikowanych u *R. prolixus* oraz *C. viridis* z akwaporynami ssaków wykazano, że są one najbliższe sekwencji AQP1 [8, 18].

Sekwencja aminokwasowa Rp-MIP jest identyczna w 26% z sekwencją ssaczej AQP1. Kanały tworzone przez oba białka wykazują analogiczną lokalizację, gdyż zarówno u pluskwiaka, jak i u ssaków, występują w narządzie odpowiedzialnym za formowanie i wydalanie moczu. Jednak Rp-MIP różni się pod kilkoma względami od AQP1. Akwaporyna ssaków przewodzi wodę w znacznym tempie, a transport ten jest hamowany przez jony rtęci [32]. Rp-MIP przyspiesza transport wody tylko dwukrotnie, przy czym nie podlega on hamowaniu jonami rtęci [8].

Znaczne podobieństwo do ssaczej AQP1 charakteryzuje sekwencję aminokwasową akwaporyny AQP_{cic} z *C. viridis*. Obie sekwencje są identyczne w 43% [7]. Szybkość transportu wody przez AQP_{cic} jest większa niż w przypadku Rp-MIP, jednak i tak nie dorównuje szybkości przewodzenia AQP1 [18]. Transport przez kanał jest hamowany przez jony rtęci, jednak przyczyna inhibicji jest różna. W przypadku AQP1 jony rtęci blokują kanał wskutek oddziaływania z Cys189 w pętli E, natomiast w przypadku AQP_{cic} wskutek oddziaływania z Cys82 i 90 w pętli B oraz Cys135 w pętli C. Różnica ta przekłada się na stężenie jonów rtęci potrzebnych do zahamowania transportu, gdyż dzięki takiej lokalizacji cystein akwaporyna *C. viridis* jest 3 lub 4 razy bardziej odporna na działanie jonów rtęci [18].

5. PODSUMOWANIE

Występujące u bezkręgowców akwaporyny wykazują wszystkie typowe dla tej grupy białek cechy. Transportują one wodę oraz w niektórych przypadkach glicerol i mocznik. W sekwencji ich łańcucha polipeptydowego można wyróżnić sześć domen transbłonowych oraz, poza nielicznymi wyjątkami, dwa motywy NPA wyścielające wnętrze poru. Również oba końce łańcucha polipeptydowego zlokalizowane są po cytoplazmatycznej stronie błony komórkowej.

Porównując budowę, występowanie i funkcję dotychczas zidentyfikowanych akwaporyn bezkręgowców z odpowiadającymi im białkami budującymi wiele dobrze już poznanych i scharakteryzowanych kanałów wodnych zwierząt kręgowych (np. ssaków) zauważyć można zarówno znaczne podobieństwo sekwencji aminokwasowej, jak i pełnienie podobnej funkcji u obu grup zwierząt.

Charakterystyka akwaporyn ssaków ukazuje coraz większą różnorodność funkcji, jakie pełnią te białka. Badania wśród bezkręgowców mogą tę wiedzę znacznie poszerzyć.

Rozpatrując obecny postęp w badaniach dotyczących kanałów wodnych można stwierdzić, że zgłębianie tego zagadnienia u zwierząt bezkręgowych jest w fazie początkowej. W porównaniu z kanałami wodnymi kręgowców scharakteryzowano dotąd tylko nieliczne akwaporyny bezkręgowców. Ze względu na olbrzymie bogactwo gatunków i ich różnorodnych przystosowań środowiskowych, chociażby tylko w obrębie gromady owadów, można się spodziewać istnienia olbrzymiej liczby kanałów wodnych dotąd niezbadanych i pełniących różnorodne funkcje w organizmach bezkręgowców. Identyfikacja i charakterystyka tworzących je białek może stwarzać podwaliny do różnych bardzo istotnych dla człowieka działań aplikacyjnych. Praktyczne zastosowanie wiedzy o akwaporynach jest już od kilku lat testowane [33]. Przykładem mogą być tu badania nad akwaporynami pierwotniaków pasożytniczych (np. zarodźca malarii). Opublikowane wyniki eksperymentów wskazują na możliwość walki z tymi organizmami poprzez stosowanie leków działających jako inhibitory kanałów wodnych [2, 3, 4].

LITERATURA

- [1] AGRE P. Aquaporins water channels. *Angew Chem Int Ed* 2004; **43**: 4278–4290.
- [2] BAHOMONTES-ROSAN, BINGUHA W, BEITZ E, KREMSNER PG, KUN JFJ. Limited genetic diversity of the *Plasmodium falciparum* aquaglyceroporin gene. *Mol Biochem Parasitol* 2007; **156**: 255–257.
- [3] BAHOMONTES-ROSAN, ROBINA, AMBROSIO AR, MESSIAS-REASON I, BEITZ E, FLITSCH SL, KUN JFJ. Monoquaternary ammonium derivatives inhibit growth of protozoan parasites. *Parasitol Int* 2008; **57**: 132–137.
- [4] BEITZ E. Aquaporins from pathogenic protozoan parasites: structure, function and potential for chemotherapy. *Biol Cell* 2005; **97**: 373–383.
- [5] CAMPBELL EM, BALL A, HOPPLER S, BOWMAN AS. Invertebrate aquaporins: a review. *J Comp Physiol B* 2008; **178**: 935–955.
- [6] CASTLE NA. Aquaporins as targets for drug discovery. *Drug Discov Today* 2005; **10**: 485–493.
- [7] DUCHESNE L, HUBERT JF, VERBAVATZ JM, THOMAS D, PIETRANTONIO PV. Mosquito (*Aedes aegypti*) aquaporin present in tracheolar cells, transports water not glycerol and forms orthogonal arrays in *Xenopus* oocyte membranes. *Eur J Biochem* 2003; **270**: 422–429.
- [8] ECHEVARRIA M, REMIREZ-LORCA R, HERNANDEZ CS, GUTIERREZ A, MENDEZ-FERRER S, GONZALEZ E, TOLEDO-ARAL JJ, ILUNDAIN AA, WHITTEMBURY G. Identification of a new water channel (Rp-MIP) in the Malpighian tubules of the insect *Rhodnius prolixus*. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 2001; **442**: 27–34.
- [9] FU L, LU M. The structural basis of water permeation and proton exclusion in aquaporins (Review). *Mol Membr Biol* 2007; **24**: 366–374.
- [10] GONEN T, WALZ T. The structure of aquaporins. *Q Rev Biophys* **39**: 361–396.
- [11] HOHMANN J, BILL RM, KAYINGO J, PRIOR BA. (2000) Microbial MIP channels. *Trends Microbiol* 2006; **8**: 33–38.
- [12] HUANG CG, LAMITINA T, AGRE P, STRANGE K. Functional analysis of the aquaporin gene family in *Caenorhabditis elegans*. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; **292**: C1867–C1873.
- [13] HUANG Y, TRACY R, WALSBERG GE, MAKKINJE A, FANG P, BROWN D, VAN HOCK AN. Absence of aquaporin-4 water channels from kidneys of the desert rodent *Dipodomys merriami merriami*. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; **280**: F794–802.
- [14] KALDENHOFF R, FISCHER M. Aquaporins in plants. *Acta Physiol* 2006; **187**: 169–176.
- [15] KAUFMANN N, MATHAI JC, HILL WG, DOW JAT, ZEIDEL ML, BRODSKY JL. Developmental expression and biophysical characterization of a *Drosophila melanogaster* aquaporin. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; **289**: C397–C407.
- [16] KUWAHARAM, ASAIT, SATO K, SHINBO I, TERADAY, MARUMOF, SASAKI S. Functional characterization of a water channel of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1517**: 107–112.

- [17] KUWAHARA M, ISHIBASHI K, GU Y, TERADA Y, KOHARA Y, MARUMO F, SASAKI S. A water channel of the nematode *C. elegans* and its implications of channel selectivity of MIP proteins. *Amer J Phys Cell Phys* 1998; **275**: C1459–C1464.
- [18] LE CAHEREC F, DASCHAMPS S, DELAMARCHE C, PELLERIN I, BONNEC G, GUILLAM MT, THOMAS D, GOURANTON J, HUBERT JF. Molecular cloning and characterization of an insect aquaporin. Functional comparison with aquaporin 1. *Eur J Biochem* 1996; **241**: 707–715.
- [19] LOUKAS A, HUNT P, MAIZELS RM. Cloning and expression of an aquaporin-like gene from a parasitic nematode. *Mol Biochem Parasitol* 1999; **99**: 287–293.
- [20] MAHAK, ARMSTRONG KR, CHEW DS, CHU JS, TU DK, JOHNSEN RC, CHEN N, CHAMBERLIN HM, BAILLIE DL. Transcriptional regulation of AQP-8, a *Caenorhabditis elegans* aquaporin exclusively expressed in the excretory system, by the POU homeobox transcription factor CEH-6. *J Biol Chem* 2007; **282**: 28074–28086.
- [21] MARTINEZ AS, CUTLER CP, WILSON GD, PHILLIPS C, HAZON N, CRAMB. Cloning and expression of three aquaporin homologues from the European eel (*Anguilla anguilla*): effects of seawater acclimation and cortisol treatment on renal expression. *Biol Cell* 2005; **97**: 615–627.
- [22] MORISHITA Y, SAKUBE Y, SASAKI S, ISHIBASHI K. Molecular mechanisms and drug development in aquaporin water channel diseases: Aquaporin superfamily (superaquaporins): Expansion of aquaporins restricted to multicellular organisms. *J Pharmacol Sci* 2004; **96**: 276–279.
- [23] MURATA K, MITSUOKA K, HIRAL T, WALZ T, AGRE P, HEYMANN JB, ENGELA, FUJIYOSHI Y. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 2000; **407**: 599–605.
- [24] PIETRANTONIO PV, JAGGE C, KEELEY LL, ROSS LS. Cloning of an aquaporin-like cDNA and *in situ* hybridization in adults of the mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Insect Mol Biol* 2000; **9**: 407–418.
- [25] RAMIREZ-LORCA R, MUNOZ-CABELLO AM, TOLEDO-ARAL JJ, ILONDAIN AA, ECHEVARRIA M. Aquaporins in chicken: localization of ck-AQP5 along the small and large intestine. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2006; **143**: 269–277.
- [26] RASH JE, YASUMURAT, HUDSON CS, AGRE P, NIELSEN S. Direct immunogold labeling aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 11981–11986.
- [27] SONG Y, JAYARAMAN S, YANG B, MATTHAY MA, VERKMAN AS. Role of aquaporin water channel in airway fluid transport. *J Gen Physiol* 2001; **117**: 573–582.
- [28] SUZUKI M, HASEGAWA T, OGUSHI Y, TANAKA S. Amphibian aquaporins and adaptation to terrestrial environments: a review. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2007; **148**: 72–81.
- [29] TAKATA K, MATSUZAKI T, TAJIKA Y. Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane. *Prog Histochem Cytochem* 2004; **39**: 1–83.
- [30] TANGHE A, VAN DIJCK P, THEVELEIN JM. Why do microorganisms have aquaporins? *Trends Microbiol* 2006; **14**: 78–85.
- [31] WANG Y, TAJKHORSHID. Molecular mechanisms of conduction and selectivity in aquaporin water channels. *J Nutr* 2007; **137**: 1509S–1515S.
- [32] WU B, BEITZ E. Aquaporins with selectivity for unconventional permeants. *Cell Mol Life Sci* 2007; **64**: 2413–2421.
- [33] YOOL AJ. Functional domains of aquaporin-1: Keys to physiology, and targets for drug discovery. *Curr Pharm Des* 2007; **13**: 3212–3221.
- [34] ZELENINA M, ZELENIN S, APERIA A. Water channels (aquaporins) and their role for postnatal adaptation. *Pediatr Res* 2005; **57**: 47R–53R.

Redaktor prowadzący – Lilla Hryniewiecka

Otrzymano: 12.03. 2009 r.

Przyjęto: 02.04. 2009 r.

dr Joanna Romana Pieńkowska

Zakład Biologii Komórki; Uniwersytet im. Adama Mickiewicza;

Umultowska 89, 61-614 Poznań

e-mail: pienkowj@amu.edu.pl