

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**  
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

**AQUAPORINY**  
BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**AUTOR PRÁCE:** Veronika Tejkalová

**VEDOUCÍ PRÁCE:** RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

**2013**

**UNIVERSITY OF PARDUBICE**  
**FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY**  
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCES

**AQUAPORINS**

BACHELOR WORK

**AUTHOR:** Veronika Tejkalová

**SUPERVISOR:** RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

**2013**

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2012/2013

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Veronika Tejkalová**  
Osobní číslo: **C10469**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Název tématu: **Aquaporiny**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1) Zpracujte literární rešerši zaměřenou na tematiku buněčných transportních kanálů pro vodu - aquaporinů. V kompilační práci se nejprve zaměřte na stručný popis metabolismu vody v ledvinách. Následně podrobně popište mechanismus účinku a regulaci působení aquaporinů v ledvinách, popř. v dalších buňkách. V rešerši dále detailně popište rozdělení aquaporinů s uvedením jejich odlišností.
- 2) Ke zpracování kompilace využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. ScienceDirect, HighWire, NCBI Pubmed, apod.


Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Rozsah pracovní zprávy: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**  
Seznam odborné literatury:  
**Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.**

Vedoucí bakalářské práce: **RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **13. prosince 2012**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **19. července 2013**

  
prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.  
děkan

L.S.

  
doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 15. února 2013

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako Školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Veronika Tejkalová

## **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce RNDr. Tomáši Roušarovi, Ph.D. za odbornou pomoc, cenné rady a poskytnuté materiály, které mi pomohly při zpracování bakalářské práce. V neposlední řadě děkuji své rodině, která mi byla velkou oporou.

## **Souhrn**

Voda je hlavní složkou všech organismů a rostlin. Transport vody je většinou zprostředkován aquaporiny, 28 kDa integrálními membránovými proteiny, které jsou uloženy v buněčných membránách.

Do proteinových kanálků lze zařadit aquaporiny, aquaglycerporiny a superaquaporiny. Aquaporiny propouští pouze vodu, zatímco aquaglycerporiny jsou propustné i pro malé neutrální molekuly, jako je například glycerol. Superaquaporiny jsou nově objevené proteinové kanálky, u nichž se zatím neví, jaký je jejich význam. Mezi superaquaporiny lze zařadit aquaporin 11 (AQP11) a aquaporin 12 (AQP12).

Struktura aquaporinů je tvořena čtyřmi monomery tvořícími tetramer. Monomer je složen z šesti transmembránových válcových domén, které jsou spojeny smyčkami, které připomínají model přesýpacích hodin. Tři smyčky (A, C, E) jsou uloženy na extracelulárním povrchu a dvě smyčky (B, D) se nachází na intracelulární části buněčné membrány. V nejužším bodě smyček B a E se vyskytují aminokyselinové trojice NPA (asparagin-prolin-alanin), které jsou orientovány poblíž selektivního filtru, jenž zabraňuje průchodu částic s nábojem.

## **Klíčová slova**

aquaporiny, voda, antidiuretický hormon, ledviny

## **Summary**

Water is main component of all organisms. Water transport is mediated by 28 kDa integral membrane proteins, aquaporins, occurring in cell membranes.

Members of protein channels are aquaporins, aquaglyceroporins and superaquaporins. Aquaporins select only water, but aquaglyceroporins select even small neutral molecules such as glycerol. Superaquaporins are new discovered protein channels at which we don't know their purpose yet. Members of superaquaporins family are aquaporin 11 (AQP11) and aquaporin 12 (AQP12). Water transport fluctuation is caused by vasopresin presence which regulates this fluctuation.

Structure of aquaporins consists of four monomers forming a tetramers. One monomer is composed of six transmembrane domains, which are connected by loops, look like an hour-glass. Three loops (A, C, E) are placed on extra cellular surface and two remaining loops (B, D) occur on intra cellular surface. In the narrowest place between loops B and E, NPA amino acid triplets (asparagin-prolin-alanin) are which account for selective filter, preventing ion passage.

## **Keywords**

aquaporins, water, vasopresin, kidneys



## **Seznam zkratek**

Å	Ångström
ACE	angiotenzin konvertující enzym
ADH	antidiuretický hormon
ANP	atriální natriuretický peptid
AQP	aquaporin
Ar/R	aromatické/arginin sevření
Arg	arginin
Asn	asparagin
ATP	adenosintrifosfát
BNP	mozkový natriuretický peptid
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cDNA	buněčná DNA
CNP	natriuretický peptid typu C
Co	antigen Colton
ECT	extracelulární tekutina
GCL	gangliová buněčná vrstva
GFR	glomerulární filtrace
GLIP	vnitřní glycerolový protein
GlpF	aquaglycerporin
CHIP28	kanálek tvořící intergrální protein
ICT	intracelulární tekutina
INL	vnitřní jaderná vrstva
IPL	vnitřní vrstva plexiformu
kb	kilobáze
kcal	kilokalorie

kDa	kilodalton
MIP	hlavní vnitřní protein
NDI	nefrogenní diabetes insipidus
NPA	sekvence asparagin-prolin-alanin
NPC	sekvence asparagin-prolin-cystein
NPT	sekvence asparagin-prolin-threonin
ONL	vnější jaderná vrstva
Ser	serotonin
siRNA	malá interferující RNA
TBW	celková tělní tekutina
V2	receptor vazopresinu
WCP	proteinový vodní kanál

## Obsah

<b>1. Úvod.....</b>	<b>13</b>
<b>2. Teoretická část.....</b>	<b>14</b>
2.1 Metabolismus vody .....	14
2.2 Ledviny .....	15
2.2.1 Anatomie ledvin .....	15
2.2.2 Nefron .....	16
2.2.2.1 Glomerulus.....	16
2.2.2.2 Proximální tubulus .....	16
2.2.2.3 Henleova klička.....	17
2.2.2.4 Distální tubulus a sběrný kanálek.....	17
2.2.3 Funkce ledvin .....	18
2.2.4 Glomerulární filtrace.....	19
2.3 Hormonální řízení metabolismu vody.....	19
2.3.1 Antidiuretický hormon .....	19
2.3.2 Renin-angiotenzin-aldosteronový systém .....	20
2.3.3 Atriální natriuretický peptid.....	20
2.4 Aquaporiny.....	21
2.4.1 Historie.....	22
2.4.2 Struktura a regulace aquaporinu.....	23
2.4.3 Rozdělení aquaporinů.....	26
2.4.4 Aquaporin 0 – AQP0.....	27
2.4.5 Aquaporin 1 - AQP1 .....	28
2.4.6 Aquaporin 2 – AQP2.....	30
2.4.6.1 Struktura AQP2.....	30
2.4.6.2 Regulace AQP2.....	31
2.4.7 Aquaporin 3 – AQP3.....	32
2.4.8 Aquaporin 4 – AQP4.....	33
2.4.8.1 Struktura AQP4.....	33
2.4.8.2 Regulace AQP4.....	34
2.5 Patofyziologie .....	34
2.5.1 Katarakta a vady oka .....	35
2.5.2 Nefrogenní diabetes insipidus .....	36
2.5.3 Akumulace lipidů .....	36
2.5.4 Mozkový nádor .....	36
2.5.5 Hypoalgiezie nedostatkem AQP4 .....	37

<b>3. Závěr .....</b>	<b>38</b>
<b>4. Seznam literatury .....</b>	<b>39</b>

## 1. Úvod

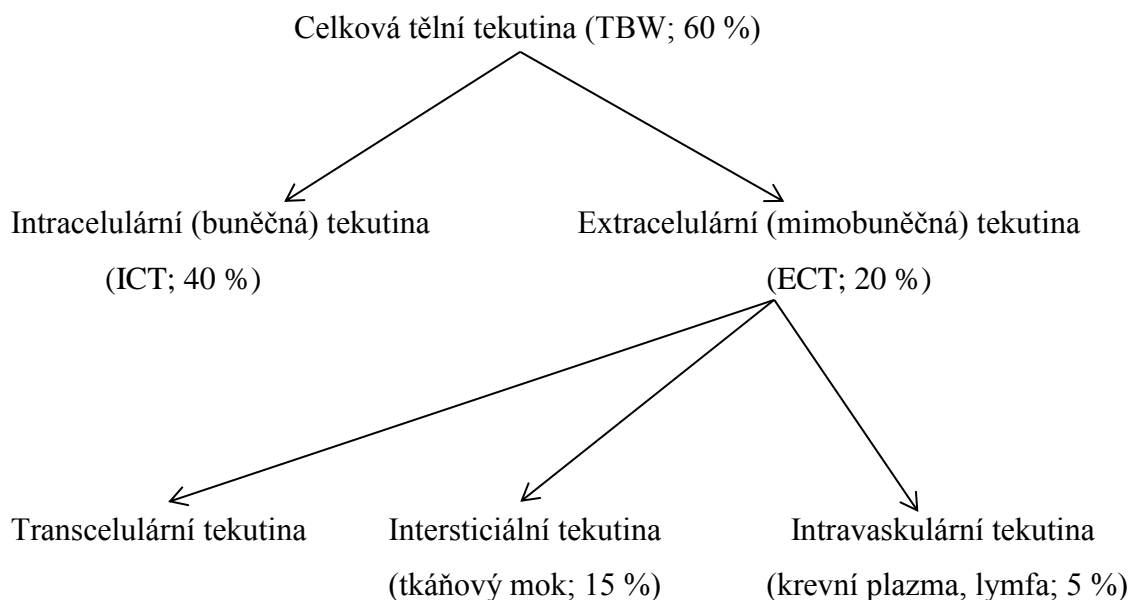
Voda je základní součástí všech živých organismů. Lidské tělo je tvořeno z vody ze 60 %. Z tohoto tvoří více než 2/3 intracelulární tekutina a 1/3 tekutina extracelulární. Množství vody v těle je regulováno pomocí ledvin, jejichž základní funkční jednotkou je nefron. V lidských ledvinách se nachází více než milion nefronů, v nichž jsou především umístěny proteinové kanálky, tzv. aquaporiny, fungují jako transportér vody.

## 2. Teoretická část

### 2.1 Metabolismus vody

Voda je nezbytná součást živých organismů a složka všech lidských buněk a tkání. Plazmatická membrána je hlavní překážkou pohybu vody mezi buňkami. Plazmatická membrána odděluje intracelulární část buňky od extracelulárního prostředí [1, 47]. Osmóza je pasivní transport vody přes semipermeabilní membránu z místa s nízkou koncentrací rozpuštěných látek do místa se zvýšenou koncentrací. Polopropustné membrány propouštějí vodu, ale zachycují některé rozpuštěné látky. Osmotický gradient zajišťuje základní způsob pohybu vody v buněčných systémech a tím vyrovnává osmolalitu [52].

Voda se uplatňuje jako rozpouštědlo, ve kterém probíhají skoro všechny biologické děje, a které umožňují organismu homeostatickými procesy udržovat osmotickou, elektrochemickou, teplotní a metabolickou rovnováhu. Zprostředkovává transport živin a produktů katabolismu v buňkách i mezi buňkami. Objem  $H_2O$  v organismu se během života mění, klesá s věkem. V těle je voda nerovnoměrně rozdělena do dvou hlavních částí (obr. 1). Dvě třetiny celkové tělesné vody zaujímá intracelulární tekutina (ICT) a zbývající třetinu extracelulární tekutina (ECT).



**Obr. 1: Rozdělení celkové tělní vody, upraveno dle [16]**

Hlavní řízení vodní bilance závisí na kontrolním mechanismu vykonávaném hypotalamem pomocí antidiuretického hormonu (ADH, vazopresin) a na vylučování a zadržování vody ledvinami. Příčiny ztráty vody mohou být při průjmových onemocněních, ledvinami při diabetes mellitus, nebo důsledkem snížení jejího příjmu. Přebytek tělesné vody je způsoben selháním ledvin či zvýšeným příjmem tekutin. Aby byla vodní bilance zachována, musí se tedy příjem tekutin rovnat výdeji (asi 2,5 l/den). Vodu přijímáme ve formě pití a potravy a vylučujeme ji ledvinami (60 %), plicemi (15 %), kůží-pocením (20 %) a stolicí (5 %). Extracelulární a intracelulární tekutina obsahuje vysokomolekulární organické látky, nízkomolekulární organické látky, elektrolyty a vodu. Hlavní rozdíl mezi ECT a ICT je v poměru složení iontů (tab. 1) [30, 52].

**Tab. 1: Porovnání koncentrace iontů v ECT a ICT, upraveno dle [26]**

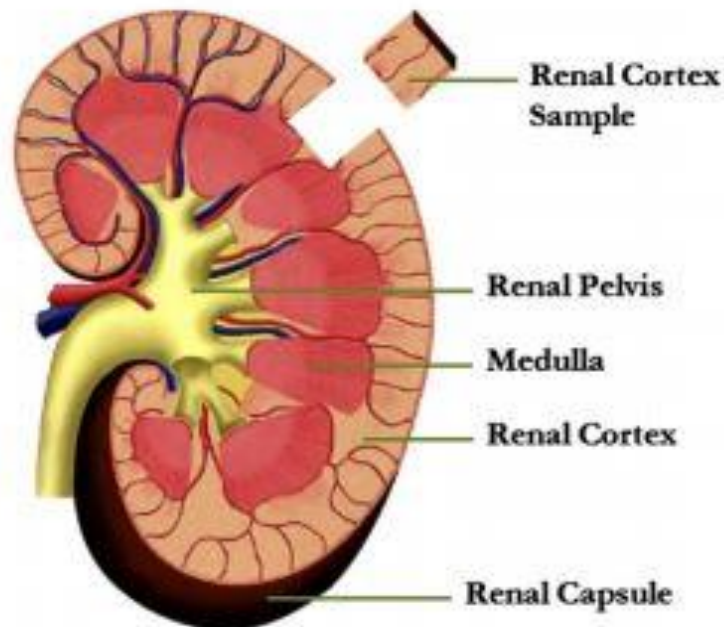
<b>Látka</b>	<b>Extracelulární tekutina</b>	<b>Intracelulární tekutina</b>
Na <sup>+</sup>	140 mmol/l	10 mmol/l
K <sup>+</sup>	4 mmol/l	140 mmol/l
Ca <sup>2+</sup> (volný)	2,5 mmol/l	0,1 mmol/l
Mg <sup>2+</sup>	1,5 mmol/l	30 mmol/l
Cl <sup>-</sup>	100 mmol/l	4 mmol/l
HCO <sup>-</sup>	27 mmol/l	10 mmol/l
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	2 mmol/l	60 mmol/l
Glukóza	5,5 mmol/l	0 – 1 mmol/l
Protein	20 g/l	160 g/l

## 2.2 Ledviny

### 2.2.1 Anatomie ledvin

Ledviny jsou párové retroperitoneální orgány fazolovitého tvaru, umístěné na obou stranách páteře. Ledvinu lze rozdělit na okrajovou tmavší část, což je kůra (*cortex renalis*), a světlejší vnitřní část, neboli dřeň (*medulla renalis*). Na povrchu se nachází vazivové pouzdro (obr. 2). Nervy, lymfatické cévy, renální arterie a vena prochází hlem, kde z něj vybíhá ledvinná pánvička, přecházející do ureteru

(močovodu). Základní funkční jednotkou ledvin je nefron a každá ledvina jich má přes milion. Nefron se skládá z 5 hlavních částí (obr. 3). V kůře ledvin se nachází glomerulus, proximální a distální tubulus. Naproti tomu ve dřeni se vyskytují sběrné kanálky a Henleova klička, která částečně zasahuje i do kůry [52].



Obr. 2: Anatomie ledvin [49]

## 2.2.2 Nefron

### 2.2.2.1 Glomerulus

Glomerulus je složen z klubka cév, které jsou větvemi *arteria renalis*. Počáteční přívodná céva (*vas afferens*) přivádí krev se zplodinami metabolismu. Tato céva se stáčí do klubka (*glomerulus*) a z něj pak vystupuje odvodná céva (*vas efferens*). Glomerulus je obklopen Bowmanovým pouzdem. Tato část nefronu je určena k filtraci krve a vylučování látek. Hlavní funkcí glomerulu je tvorba primární moče, její množství je 170 – 180 l za 24 hod.

### 2.2.2.2 Proximální tubulus

Hlavní funkcí proximálního tubulu je zpětná resorpce. Buňky, které se nachází v tomto tubulu, absorbují z filtrátu okolo 2/3 sodíku a za sodíkem pasivně putuje voda. Množství filtrátu se tím zmenšuje asi na polovinu. Hnací silou je tedy vstřebávání



osmoticky účinných iontů, jako jsou například  $\text{Cl}^-$  a  $\text{Na}^+$ . Tubulární tekutina se touto resorpcí zředí, ale voda osmotický gradient ihned vyrovnává, a proto je tekutina v této části nefronu izotonická. Voda je v proximálním tubulu resorbována paracelulárně nebo prostřednictvím kanálů pro vodu, tzv. aquaporinů 1 (AQP1). Další hnací silou pro resorpci vody je onkotický tlak v peritubulárních kapilárách [44].

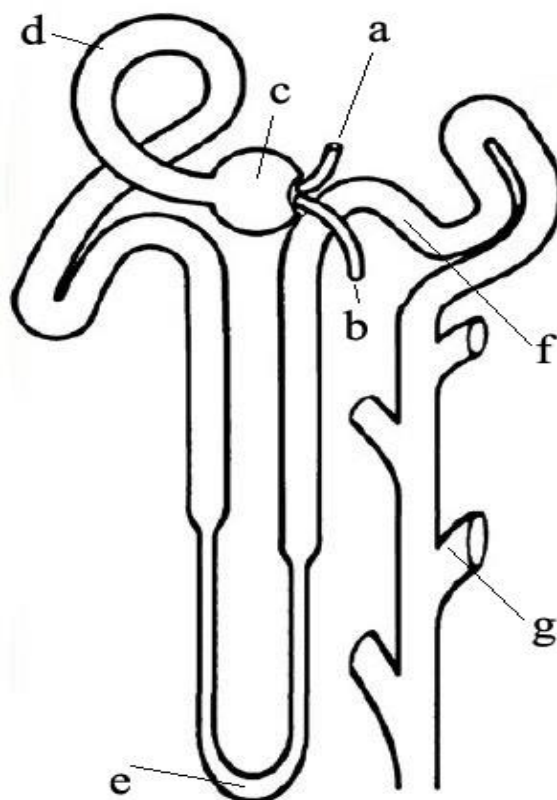
Většina glukózy, fosfátů, aminokyselin a hydrogenuhličitanů je zpětně vstřebávána v proximálním tubulu společně s 60-70 %  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  a močoviny. Pro každou přenášenou látku existuje maximální mez vstřebávání a vylučování. Glukóza je plně resorbována v proximálním tubulu, nepřekročí-li její koncentrace ledvinový práh. V případě, že je její koncentrace vyšší než 11 mmol/l, přenašeče jsou nasyceny a glukóza se objevuje v moči [52].

### **2.2.2.3 Henleova klička**

Henleova klička má podobu písmene U. Je složena z úzkého sestupného a širokého vzestupného raménka. Moč vstupuje do sestupného raménka a v porovnání s plazmou je izotonická. K zajištění tvorby hypertonické moči slouží klička jako protiproudový multiplikátor a tvoří v intersticiální tekutině dřeně osmotický gradient. Tenké sestupné raménko je propustné pro vodu a minerály, zatímco vzestupné raménko je nepropustné pro vodu a aktivně secernuje  $\text{Na}^+$  a  $\text{Cl}^-$ .

### **2.2.2.4 Distální tubulus a sběrný kanálek**

Do distálního tubulu vstupuje tekutina, která je hypotonická. Tento tubulus a sběrný kanálek nejsou pro močovinu propustné, ale jsou propustné pro vodu v přítomnosti antidiuretického hormonu, který vyvolá vřazení speciálních kanálků pro vodu aquaporinu 2 (AQP 2) do apikální membrány. Voda prostupuje do intersticia kůry a tubulární tekutina se koncentruje. Konečná úprava množství moči tedy probíhá ve sběracím kanálku vlivem ADH. Voda je kvůli vysoké osmolalitě intersticia dřeně zpětně vstřebávána a definitivní moči se denně vytvoří kolem 1,0-1,5 l.



Obr. 3: Stavba nefronu (a – přívodná céva, b – odvodná céva, c – glomerulus, d – proximální tubulus, e – Henleova klička, f – distální tubulus, g – sběrný kanálek), upraveno dle [13]

### 2.2.3 Funkce ledvin

Ledviny se podílejí na udržování stálého vnitřního prostředí, homeostázy. Udržování stálého složení tělních tekutin je zprostředkováno tím, že podle potřeb organismu vylučují nebo zpětně resorbují soli a vodu. Významně se také účastní na udržování stálosti pH vnitřního prostředí organismu tím, že způsobují sekreci  $H^+$  iontů a naopak zadržují v těle amonné ionty, které neutralizují kyseliny. Ledviny z těla dále vylučují odpadní látky jako je kyselina močová, močovina a kreatinin, které vznikají jako produkty metabolismu bílkovin. Kromě výše uvedených funkcí ledviny také vytvářejí hormony. V kůře ledvin je tvořen hormon erythropoetin, který reguluje křetvorbu červených krvinek v kostní dřeni a dále hormon renin, který štěpí angiotenzinogen na angiotenzin I.

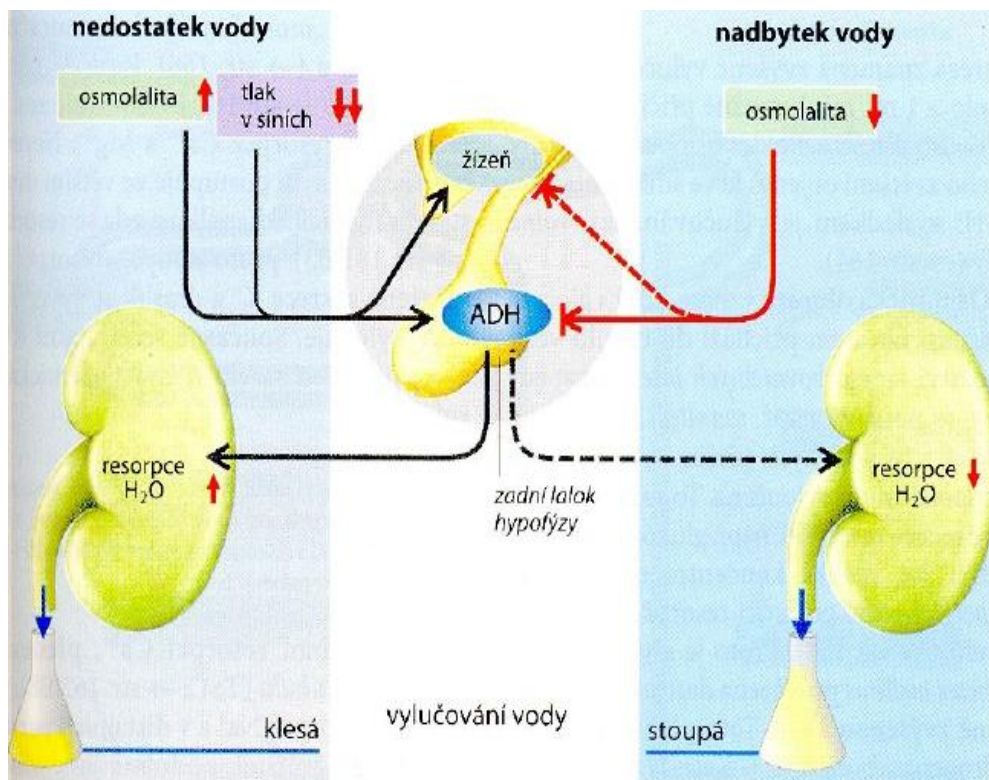
#### **2.2.4 Glomerulární filtrace**

Glomerulární filtrace (GFR) je objem plazmy, která je očištěna od dané látky za jednotku času při průtoku ledvinami. K výpočtu GFR se nejčastěji používá kreatinin. Je to látka volně filtrovatelná a zpětně se neresorbuje, je bezprahová. Velikost GFR je závislá na tlaku krve v glomerulárních kapilárách a průtoku krve ledvinami. Fyziologická hodnota glomerulární filtrace je okolo 120 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> tělesného povrchu [44].

### **2.3 Hormonální řízení metabolismu vody**

#### **2.3.1 Antidiuretický hormon**

Na regulaci vodní bilance v organismu se nejvíce podílí antidiuretický hormon. Je produkován v hypotalamu a vylučován v neurohypofýze v reakci na zvýšenou osmolaritu extracelulární tekutiny, popřípadě kvůli poklesu objemu ECT (obr. 4). ADH se v ledvinách váže na specifický receptor, který se nachází v distálním tubulu a obzvláště ve sběrném kanálku. Výsledkem vazby je stimulace adenylcyklázy, což vede k tvorbě cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP), ten aktivuje proteinkinázy a důsledkem je zvyšování množství aquaporinů v apikální membráně, protože ADH podněcuje jejich přemístění z intracelulárních depot do této membrány. Jestliže ADH není přítomen, jsou aquaporiny uskladněny a membrána je pro vodu nepropustná. Čím více je tedy antidiuretického hormonu v plazmě, tím více se voda pasivně vstřebává ve směru svého osmotického gradientu [29].



Obr. 4: Řízení hospodaření solemi a vodou [44]

### 2.3.2 Renin-angiotenzin-aldosteronový systém

Aldosteron je produkován v případě zvýšené koncentrace draslíku nebo angiotenzinu II v plazmě. Aldosteron přispívá ke vstřebávání  $\text{Na}^+$  a vylučování  $\text{K}^+$  v buňkách distálního tubulu a sběracího kanálku. Má tak velký význam pro udržení stálé koncentrace  $\text{K}^+$  iontů. Za stálý objem ECT zodpovídá renin-angiotenzin-aldosteronový systém, který při poklesu objemu cirkulující plazmy, podporuje zpětnou resorpci  $\text{Na}^+$  iontů a následně i pasivně vody. Renin odštěpuje z plazmatického substrátu angiotenzinogenu angiotenzin I. Ten je přeměněn konvertujícím enzymem (ACE), který se nachází v plicích, na konečný produkt angiotenzin II. Angiotenzin II je hormon, který hraje významnou roli v homeostáze pro  $\text{Na}^+$ . Stimuluje hypotalamus ke zvýšenému vylučování ADH, vyvolává žízeň a také vyvolává tvorbu aldosteronu kůrou nadledvin [52].

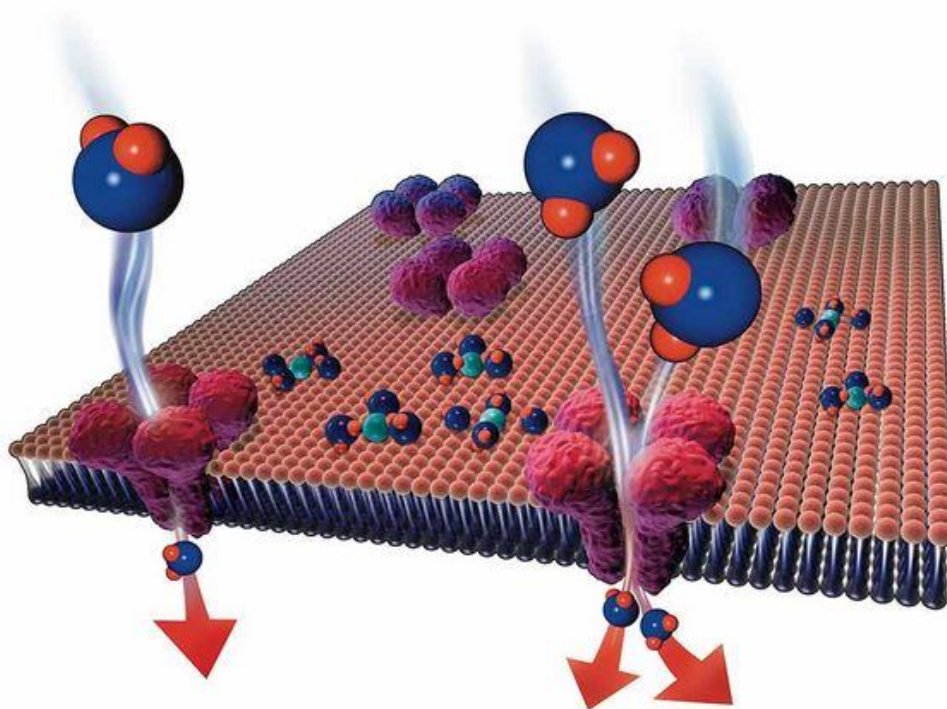
### 2.3.3 Atriální natriuretický peptid

Rodina natriuretických peptidů se částečně podílí na regulaci rovnováhy elektrolytů, krevním tlaku a kardiovaskulárním systému. Atriální natriuretický peptid

(ANP) a mozkový natriuretický peptid (BNP) mají velmi podobné funkce. Jsou převážně uvolňovány myocyty srdečních síní a komory důsledkem zvýšeného objemu krve, hypervolémii. Tyto peptidy cirkulují v krvi a endokrinním způsobem redukuje cévní napětí, zvyšují natriurézu kvůli snížení krevního objemu a tlaku. Mezi natriuretické peptidy patří také natriuretický peptid typu C (CNP). Ten je obsažen ve vaskulárních endoteliálních buňkách a působí parakrinním způsobem. ANP a BNP především regulují tekutiny a elektrolytové rovnováhy, aby regulovali tlak krve. Jejich další funkcí je inhibice tvorby ADH, aldosteronu a reninu. CNP je silný relaxant cévní hladké svaloviny, ale je relativně neúčinný, pokud jde o ovlivnění funkce ledvin [23].

## 2.4 Aquaporiny

Proteinový vodní kanál (Water Channel Protein, WCP) je transmembránový protein, který má specifickou trojrozměrnou strukturu s póry pro pronikání vody přes biologickou membránu (obr. 5). Byl objeven v jednobuněčných organismech např. v bakteriích, kvasinkách, prvocích a v mnohobuněčných organismech u zvířat a rostlin. WCP je rodina proteinů, které zahrnují tři podčeleď: aquaporiny, aquaglycerporiny a S-aquaporiny [4].



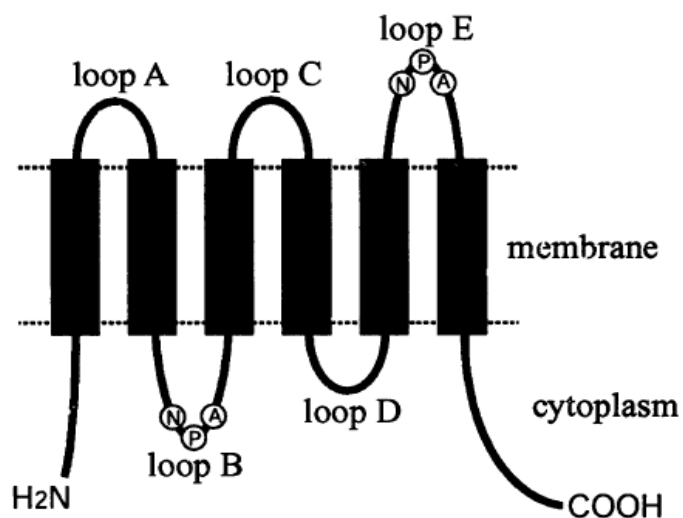
**Obr. 5: 3D struktura aquaporinů v buněčné membráně zobrazující průchod molekul vody membránou. [53]**

Aquaporiny (AQP) jsou integrální membránové proteiny, které slouží jako kanály pro převod vody, a v některých případech i malých iontů přes membránu. Název je odvozen z latinského slova *aqua*-voda a *porus*-průchod. Strukturální analýza molekul objevila přítomnost pórů v centru každé aquaporinové molekuly [47]. V savčích buňkách bylo doposud zjištěno 13 různých izoform aquaporinů. Aquaporiny (AQP0 – AQP12) jsou rozděleny do tří tříd. AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP6 a AQP8 jsou výhradně propustné pro vodu, zatímco AQP3, AQP7, AQP9 a AQP10 jsou propustné i pro malé neutrální molekuly, jako jsou glycerol, močovina a amoniak, a proto jsou nazývány aquaglycerporiny. A nově objevenou třetí třídou tvoří S-aquaporiny neboli superaquaporiny do které patří AQP11 a AQP12. Jejich funkce nebyly doposud plně objasněny, ale nejpozoruhodnějším rysem těchto dvou aquaporinů je neobvyklý sled prvního motivu asparagine-proline-alanine (NPA). AQP11 má ve svém prvním motivu místo alaninu cystein (NPC) a AQP12 má threonin (NPT). AQP8 představuje zvláštní příklad v tom, že je nepropustný pro glycerol a močovinu, ale umožňuje průchod molekul amoniaku [13, 34, 55].

## 2.4.1 Historie

Na základě nepřímého pozorování někteří vědci tvrdili, že specializované vodě propustné póry jsou nezbytné pro vysvětlení vysoké propustnosti vody v červených krvinkách a renálních tubulech. Kromě toho by propustnost těchto tkání pro vodu mohla být reverzibilně inhibována rtuťovými ionty a aktivační energie by byla podobná difúzi vody o objemu roztoku ~ 5 kcal/mol. Také bylo známo, že ve specializovaných tkáních, jako jsou savčí sběrné kanálky nebo měchýře obojživelníků docházelo ke kolísání transportu vody, která byla regulovaná antidiuretickým hormonem. Nicméně zastánci vodních kanálků nebyli schopni přesvědčit skeptiky, protože všechny pokusy izolovat nebo naklonovat molekuly vodních proteinů byly neúspěšné [1].

Až objev 28 kDa integrálního membránového proteinu v červených krvinkách a renálních tubulech ukončil spory o možnou existenci molekulárních vodních kanálů. Za tento objev aquaporinů dostal Peter Agre a Roderick MacKinnon Nobelovu cenu za chemii v roce 2003 [9]. Protein aquaporin 1, dříve známý jako CHIP28 (Channel-forming Integral Protein), byl prvně extrahován z membrán červených krvinek. Bylo zjištěno, že existuje jako tetramer s intracelulárními N- a C- konci, který má uspořádání struktury podobné několika proteinovým iontovým kanálkům [1].

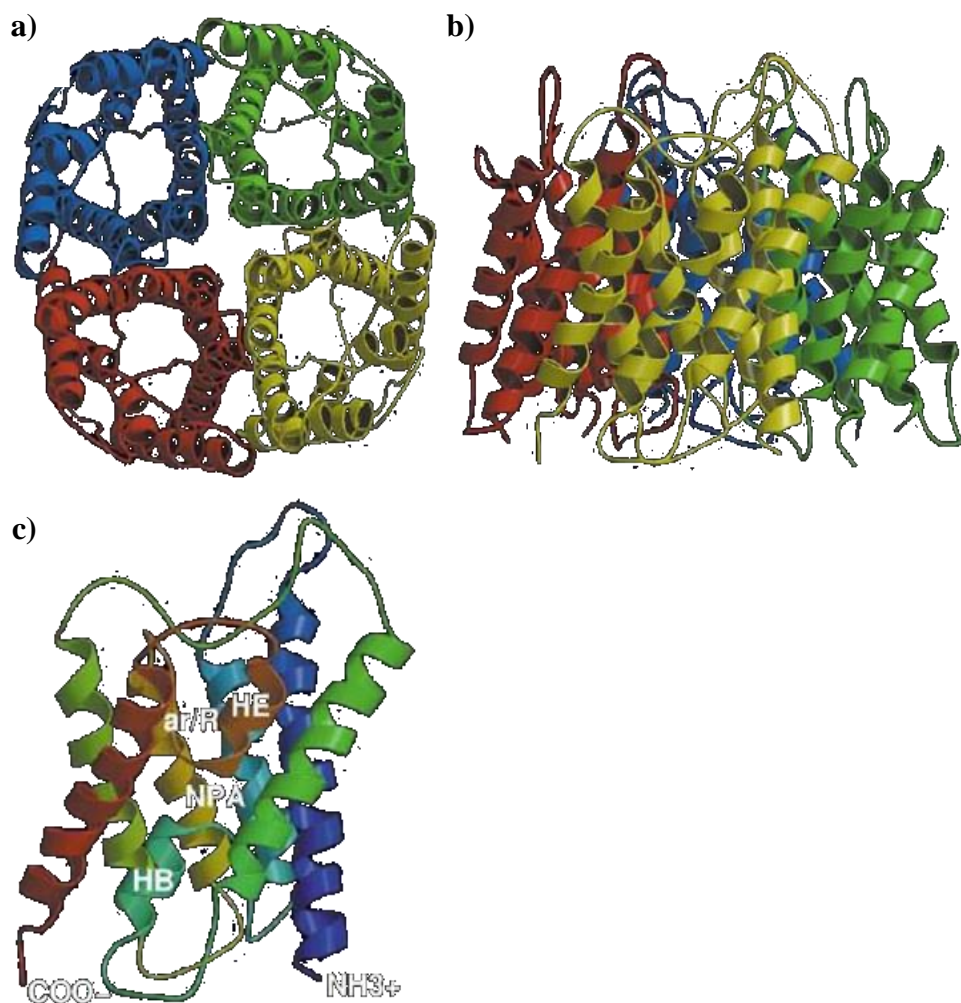


Obr. 6: Transmembránová struktura aquaporinu [47]

## 2.4.2 Struktura a regulace aquaporinu

Aquaporin se skládá z jednoduchého peptidového řetězce z cca 270 aminokyselin. Je to tetramer složený ze čtyř monomerů. Jeden monomer obsahuje 6 transmembránových spirál a N- i C- konce, které jsou uloženy intracelulárně (obr. 7). Šroubovice ( $\alpha$ -helix) každého aquaporinového monomeru, které se nacházejí na vnější straně tetrameru, jsou hydrofobní. Zatímco ty, které se nalézají v centru tetrameru, jsou hydrofilní. První a čtvrtá válcová transmembránová doména přiléhá na fosfolipidovou dvojvrstvu a další čtyři jsou spojeny prostřednictvím pěti smyček. Tyto smyčky tvoří pór pro vodu, připomínající model přesýpacích hodin (hour-glass model). Tři smyčky A, C, E jsou uloženy na extracelulárním povrchu a dvě smyčky B, D se nachází na intracelulárním povrchu (obr. 6). V nejužším místě ve smyčkách B a E je obsažena aminokyselinová trojice NPA (asparagin-prolin-alanin) [26, 47, 54].





Obr. 7: 3D struktura AQP1 a) tetramer shora, b) tetramer z boku, c) monomer

[19]

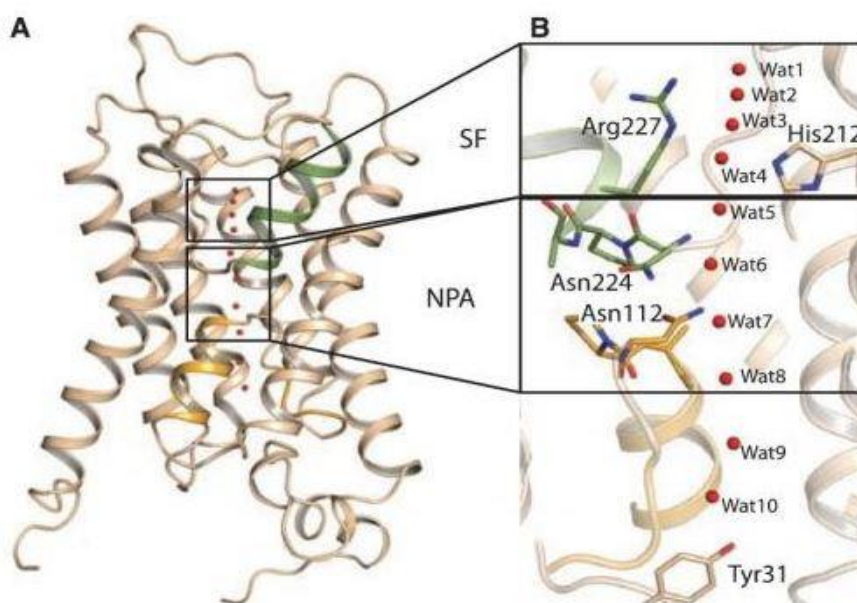
Stavba přesýpacích hodin u aquaporinu 1 má kuželovitou podobu vodou naplněné extracelulární a intracelulární předsíně, které jsou odděleny 20 Å dlouhými kanálky, jež se zužují na 2,8 Å ve svém nejužším bodě. Tento úzký kanálek omezuje velikost molekul, které mohou projít a nutí molekuly vody proplouvat po jedné (obr. 10). V kapalně formě molekuly vody mezi sebou navzájem formují vodíkové můstky, které usnadňují rychlé vedení protonů mezi molekulami. Volné vodíkové vazby se vyskytují uvnitř aquaporinových pórů kromě nejužšího místa, které je odděleno uzlem NPA trojice. V této sekci se molekuly vody reorientují na přechodnou formu částečné vodíkové vazby se zachovalými asparaginy v NPA uzlu. Bylo dokázáno, že tato reorientace vody přechodně tvoří neúplné vodíkové vazby se zachovalými asparaginy a to podporuje vodíkové vazby na kanálek, čímž se zabrání vedení protonů [8]. Popsaná struktura je podmínkou selektivity vodního kanálku pro vodu, kdy jsou



přepřavovány jen molekul vody, a není uskutečnitelný průchod hydroxoniového kationtu  $H_3O^+$ . Aquaporiny proto nejsou prostupné pro částice s nábojem [26].

Přepřava vody je podmíněna rozdílnou osmolaritou na obou stranách biologické membrány. Tedy z důvodu převahy osmolarity na jedné nebo druhé straně membrány může být pohyb obousměrný. Bylo zjištěno, že velikost propustnosti vody je extrémně vysoká  $\sim 3 \times 10^9$  molekuly vody za sekundu. Aquaporiny je možno vratně blokovat prostřednictvím  $HgCl_2$ , ale tento mechanismus se neuplatňuje u aquaporinu 6, protože naopak sloučeniny rtuti permeabilitu zvyšují [26].

Selektivní filtr je umístěn zhruba 10 Å od NPA uzlu na perioplazmatické straně (obr. 8). Tento filtr byl také znám jako aromatické/arginin (ar/R) sevření, protože obsahuje konzervované aromatické a argininové zbytky. Ar/R sevření aquaporinu 1 a aquaglycerporinu (GlpF) jsou umístěna v nejužším bodě kanálků. Rozdílné boční řetězce v ar/R sevření ovlivňují polaritu a průměr zúžené cesty kanálku, čímž odlišují aquaporiny od aquaglycerporinů. Na druhou stranu neměnné NPA sevření je nezbytné pro zabránění transportu protonů [17]. Selektivní propustnost aquaporinů tedy vychází ze struktury a týká se hlavně vody, jen v některých případech i jiných malých iontů (aquaglycerporiny mohou přenášet glycerol a polyalkoholy) [27]. GlpF se zbytkem glycinu má průměr pórů přibližně o 1 Å širší než AQP1, což umožňuje podélný průchod glycerolu [56].



**Obr. 8: NPA motiv tvořící selektivní filtr monomeru aquaporinu. (oranžová – B smyčka, zelená – E smyčka, červené body – molekuly vody) [15]**

### 2.4.3 Rozdělení aquaporinů

Klasifikace a podrobná lokalizace aquaporinů v organismu je uvedena v tabulce č. 2.

**Tab. 2: Přehled aquaporinů, upraveno dle [26, 40]**

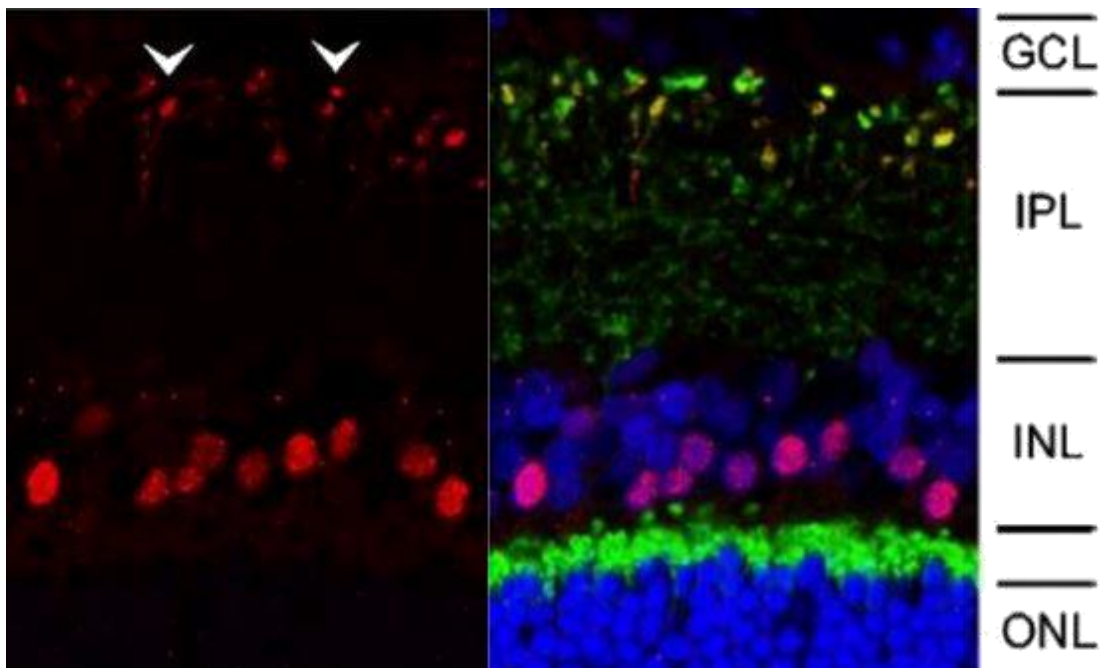
<b>Typ</b>	<b>Aquaporin</b>	<b>Hlavní lokalizace</b>	<b>Poznámka</b>
<b>renální aquaporiny</b>	AQP1	proximální tubulus, sestupné tenké raménko (apikální a bazolaterální membrána)	extrarenálně ve více tkáních (mozek, oko, srdce, plíce, játra, střevo, močový měchýř, tuková tkáň, kůže, vnitřní ucho, slinná žláza, slinivka břišní, varlata, nadvarlata, svaly, kapiláry, erytrocyty)
	AQP2	sběrný kanálek (apikální a intracelulární vezikuly hlavních buněk sběrného kanálku)	extrarenálně ve varlatech a nadvarlatech
	AQP3	sběrný kanálek (bazolaterální membrána)	extrarenálně ve více tkáních (oko, plíce, střevo, močový měchýř, kůže, slinná žláza, varlata, nadvarlata)
	AQP4	medulární část sběrného kanálu (bazolaterální membrána)	extrarenálně ve více tkáních (glie v mozku, oko, plíce, vnitřní ucho, žaludek, sval)
	AQP6	sběrný kanálek (kortikální, zevní a vnitřní medulární oblast, v intracelulárních vezikulech)	
	AQP7	kartáčová lem buněk proximálního tubulu	extrarenálně ve více tkáních (srdce, střevo, varlata, nadvarlata, adipocyty)
	AQP8	proximální tubulus a sběrný kanálek (kůra i dřev)	extrarenálně ve více tkáních (varlata, nadvarlata, játra, slinivka břišní, tlusté střevo, slinná žláza, pravděpodobně také srdce a placenta)
	AQP11	ledviny	mozek, slinivka břišní
<b>extrarenální aquaporiny</b>	AQP0	oční čočka	
	AQP5	oko, slinná žláza, plíce, slzná žláza, potní žláza, slinivka břišní	
	AQP9	játra, mozek, varlata, nadvarlata, pravděpodobně také leukocyty, slezina, plíce	renální lokalizace se považuje za možnou
	AQP10	tenké střevo	
	AQP12	slinivka břišní	

#### 2.4.4 Aquaporin 0 – AQP0

Aquaporin 0, dříve znám jako hlavní vnitřní protein (MIP, nebo MIP26), je primární vodní kanálek v buňkách vláken čočky. V mladých vláknech kůry čočky existuje AQP0 jako protein o velikosti 26 kDa. Jak vlákna buněk dospívají, tak dochází k vnořování do nižší vrstvy čočkové kůry. K udržení transparentnosti čoček musí být objem vlákna buněk a obsah vody striktně regulován. Vzhledem k tomu, že jsou čočky avaskulární, záleží regulace objemu na vnitřní mikrocirkulaci, ve které hraje také důležitou roli AQP0. Propustnost vody silně závisí na lipidovém složení membránové matricové dvojvrstvy, čili na obsahu cholesterolu a fosfolipidů. Zejména zde byla silná závislost jednotky propustnosti mezi tloušťkou dvojvrstvy a pružností. Na základě lipidového složení vláken čočkových buněk tato data naznačují, že jednotka propustnosti AQP0 je menší v jádře čoček než v kůře [48]. Permeabilita vody AQP0 je také regulována pH a  $\text{Ca}^{2+}$  ionty. Zvýšená propustnost pro vodu byla zjištěna v oocytech *Xenopus leavis*, což je způsobeno kyselým pH a sníženým počtem  $\text{Ca}^{2+}$  iontů [38].

V čočce je přítomen kromě AQP0 i AQP1, který je mu strukturně podobný. I když oba mají značnou permeabilitu pro vodu, AQP1 má 40 krát vyšší propustnost než AQP0. Jeden podstatný rozdíl mezi nimi je, že AQP0 má užší póry než AQP1 pro prostupnost vody a je lokalizován ve vláknech buňky, zatímco AQP1 se nachází pouze v epiteliálních buňkách [31].

Lokalizace AQP0 byla hodnocena imunochemicky pomocí sagitálních zmrazených řezů sítnice a optických nervů krys (obr. 9) [18]. Na rozdíl od většiny aquaporinů AQP0 má zkrácenou extracelulární smyčku mezi prvními dvěma ohyby  $\alpha$ -šroubovice [14].



**Obr. 9:** Jaderná a synaptická lokalizace AQP0 v sítnici čočky (GCL – gangliová buněčná vrstva, IPL – vnitřní vrstva plexiformu, INL – vnitřní jaderná vrstva, ONL – vnější jaderná vrstva; červená – AQP0; modrá – jádra buněk) [25]

#### 2.4.5 Aquaporin 1 - AQP1

AQP1 byl objeven jako první z aquaporinů a je složen z 269 aminokyselin. Je nepřetržitě otevřen, tudíž není hormonálně regulován. V ledvinách se vyskytuje v proximálním tubulu, sestupném tenkém raménku Henleovy kličky a naopak není přítomný ve vzestupném tenkém i tlustém raménku Henleovy kličky a distálním tubulu. Pro člověka má AQP1 hlavní význam v proximálním transportu vody a vzniku koncentrované moče prostřednictvím protiproudového mechanismu v Henleově kličce [26]. Klonováním tohoto 28 kDa integrálního membránového proteinu byla zjištěna jeho struktura. Lidský aquaporinový gen byl identifikován v místě chromozomu na lokusu 7p14. Lokalizace tohoto aquaporinu byla prokázána imunochemickým barvením [47]. AQP1 vyskytující se v oocytech *Xenopus leavis* poskytl definitivní identifikaci. Při umístění oocytu do hypotonických medií rapidně bobtná a praská. Nedávné údaje ukazují, že AQP1 také propouští CO<sub>2</sub>, ale velikost této propustnosti je mnohem nižší než u vody [28].

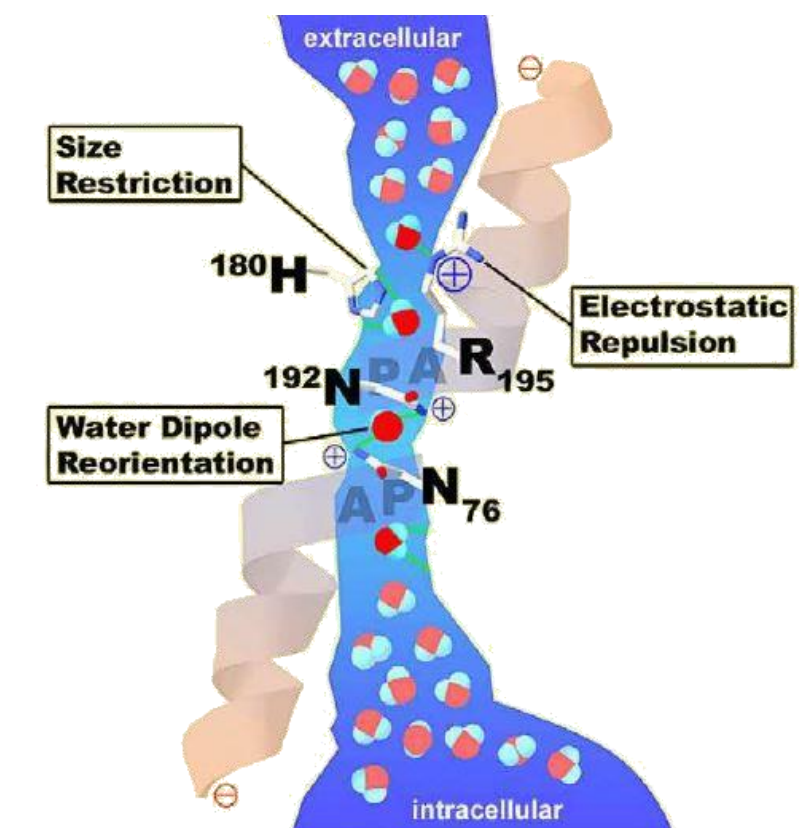
AQP1 je v erytrocytech součástí antigenu Co (Colton) krevních skupin. Jeho variabilita je dána mnohotvárností aquaporinu 1. AQP 1 může u člověka chybět bez větších klinických symptomů, nebo se vyskytuje poškození schopnosti koncentrovat moč [26]. Dále byl AQP1 prokázán ve výstelce epitelu cyst u autozomálně

dominantních polycystických ledvin, kde zajišťuje přesun tekutiny do nitra cyst. U nemocných pacientů, kteří se léčí peritoneální dialýzou, zodpovídá AQP1 v kapilárách peritonea za transport vody do peritoneálního dialyzátu [10]. Zvyšování exprese AQP1 v plicích se děje brzy po narození a zásadně mění vlastnosti plicního epitelu z hlediska schopnosti vstřebávat vodu. V mozku je AQP1 nutný k tvorbě mozkomíšního moku a jeho inhibice je potenciální možností snížení rozvoje hydrocefalu [26].

Struktura AQP1 poskytuje jedinečný selektivní mechanismus pro volné pronikání vody přes pórový kanálek a mechanismus blokování transportu pro protony. Schopnost blokovat transport protonů vysvětluje jakým způsobem ledviny reabsorbují stovky litrů vody z glomerulární filtrace každý den, zatímco se vylučují  $H^+$  ionty. První překážka pronikání protonů se nachází v nejužším extracelulárním ústí póru. Zbytek Arg-195 v zúžení je téměř zachován a nese silný kladný náboj na odpuzení protonu [30].

Anatomická struktura AQP1 byla nezávisle stanovena pomocí rentgenové analýzy. Simulace molekulární dynamiky transportu vody aquaporinem 1 vedla k pochopení, jak může být voda rychle transportována přes membrány, zatímco protony ( $H_3O^+$ ) byly odpuzovány. Na následujícím obrázku je schématický diagram představující kanálkový pór (vodní sloupec). Přenos molekul vody z extracelulárního do intracelulárního prostředí probíhá pomocí úzkého sloupce. V nejužším bodě o velikosti 8 Å, nad centrem kanálku, je zabráněno transportu protonů, a to díky velikosti omezení a elektrostatickému odpuzování. Schématická struktura aquaporinu 1 monomeru je dána třemi vlastnostmi určujícími selektivitu pro vodu, a to velikostí omezení, elektrostatickým odpuzováním a reorientací vodního pólu (obr. 10) [46].

Druhou překážkou pronikání protonů je silný dipól uprostřed pórů tvořený dvěma krátkými šroubovicemi obsahující motiv NPA. Po studiu obou struktur a simulaci molekulární dynamiky se ukázalo, že tyto četné náboje v centru AQP1 a zbytek Asn v NPA motivu přeorientují molekuly vody procházející kanálkem. Tento vodní dipól reorientací narušuje interakci vodíkové vazby mezi molekulami vody a to eliminuje možnost prostupu protonu [56].



Obr. 10: Schématická struktura AQP1 monomeru a tři vlastnosti kanálku určující selektivitu pro vodu [1]

## 2.4.6 Aquaporin 2 – AQP2

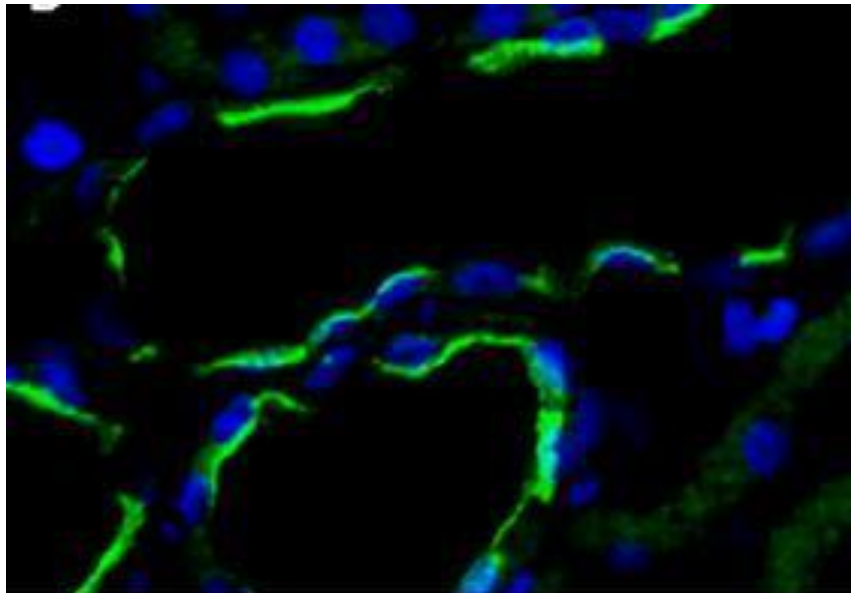
Brzy po klonování cDNA (buněčné DNA) potkaních aquaporinů 2 byl izolován lidský. Izolovaná molekula cDNA kóduje 271 aminokyselin, identické z 91 % s potkaními aquaporiny 2, které jsou lokalizovány v lidských buňkách sběrného kanálku. Gen pro AQP2 je relativně malý a je distribuován přes 5 kb (kilobáze). Skládá se ze čtyř exonů. Jeho chromozomální lokalizace je mapována na lokusu 12q13. Protože je exprese AQP2 ve sběrných kanálcích regulována vazopresinem, je možné očekávat, že mutace v genu pro AQP2 způsobí dědičné onemocnění člověka nazývané nefrogenní diabetes insipidus [43].

### 2.4.6.1 Struktura AQP2

Aquaporin 2 je 29 kDa těžký protein, který se nachází v apikální membráně sběrných kanálků ledvin (obr. 11). Na rtu' citlivá oblast se nachází v blízkosti druhého NPA motivu v cysteinu 181, ale u prvního motivu ne [2]. Byla provedena izolace rekombinantního lidského proteinu AQP2 a byla potvrzena homotetramerní struktura

AQP2 jako u ostatních aquaporinů. Bližší studie s dvoudimenzionálními krystaly aquaporinu 2 a analýzou těchto krystalů pomocí elektronové mikroskopie odhalily základní strukturu AQP2. Celkový rys AQP2 monomeru se podobá AQP1, což naznačuje, že je struktura AQP2 shodná s modelem přesýpacích hodin (obr. 7).

Funkční studie ukázaly, že propustnost vody u AQP2 je velmi vysoká. Iontová vodivost AQP2 v oocytech je téměř mizivá, a proto brání možnému pronikání protonů. Tato charakteristika je důležitá v ledvinových sběrných kanálcích, protože sběrné kanálky musí udržovat protonový gradient v normálním poměru. Propustnost glycerolu a močoviny je v AQP2 zanedbatelná, což naznačuje, že AQP2 je vysoce selektivní transportér pouze pro vodu [43].



**Obr. 11: Lokalizace AQP2 v izolovaných perfundovaných krysích ledvinách, které byly inkubovány s protilátkou namířenou proti AQP2. Snímek pořízen z fluorescenčního mikroskopu (zelená - protilátka proti AQP2; modrá - jádra buněk) [13]**

#### **2.4.6.2 Regulace exprese AQP2**

Regulovaná propustnost vody skrz buňky sběrných kanálků je nutná pro adekvátní udržování vodní bilance v těle. AQP2 má hlavní úlohu v koncentrování moči. Většina této regulace je zprostředkována transportem vody aquaporinem 2 mezi lumenální povrchem buněčných membrán a intracelulárním prostředím [43]. AQP2 je unikátní v tom, že většina buněčného AQP2 je zachována v intracelulárním prostoru v nestimulovaném stavu [47].

Mechanismus regulace aquaporinu 2 je řízen vazbou ADH na receptor V2, který je umístěn na bazolaterální membráně buněk sběrného kanálku. Tento receptor V2 je spojen s heterotrimerem G proteinu a jeho aktivní forma s guanosintrifosfátem aktivuje adenylátcyklázu. Takto vytvořený cAMP aktivuje proteinkinázu A, která fosforyluje aquaporin 2 na C- konci transmembránové domény v místě Ser<sup>256</sup> a zahajuje tak translokaci cytoplazmatických váčků směrem k apikální membráně. Aby byla translokace úspěšná, musí být fosforylovány 3 až 4 monomery aquaporinu 2 z celého tetrameru. Poté dochází k exocytóze se sloučením váčků s apikální membránou buněk sběrného kanálku, a tím je zajištěna permeabilita membrány pro vodu pomocí aquaporinu 2. Splynutí membrán cytoplazmatických vezikulů s apikální membránou probíhá na specifických místech apikální membrány. Za fúzi v buňkách sběrného kanálku jsou zodpovědné vezikulární proteiny, kam patří proteiny skupiny tSNARE (target SNARE) a proteiny na vezikulech vSNARE (vesicle SNARE). Po ukončení exocytózy je AQP2 v apikální membráně účinný a voda vstupuje do buněk sběrného kanálku. Tato voda poté opouští buňku bazolaterálně umístěnými aquaporiny 3 a 4. Konec stimulace receptoru V2 navrátí AQP2 nazpět do klidového stavu v cytoplasmě, kde je navázán na endozomy [24, 6].

### 2.4.7 Aquaporin 3 – AQP3

Aquaporin 3 byl naklonován z krysí cDNA a patří do podčeledě aquaglycerporinů. AQP3 u žáby *Xenopus oocytes* zprostředkovává transport vody rtuťově-sensitivním způsobem stejně dobře jako pro malé neiontové molekuly (glycerol). Vzhledem k této schopnosti zprostředkování pronikání glycerolu byl AQP3 také nazván GLIP (Glycerol Intrinsic Protein). Je složen z 285 aminokyselin a umístěn na genovém lokusu 9p13 [47].

V krysích ledvinách *in situ* hybridizace prokázala, že AQP3 se vyskytuje ve sběrných kanálcích. Podle imunohistochemických studií bylo zjištěno, že AQP3 je umístěn podél bazolaterální plazmatické membrány hlavních buněk ledvin. Sběrné kanálky jsou poslední částí procesu koncentrace moči v ledvinách a vodní reabsorpce v této oblasti stanovuje konečný obsah vody v moči. Ve spolupráci s apikálním aquaporinem 2 AQP3 v bazolaterální membráně slouží k vylučování vody z buněk do intersticia skrz buňky sběrných kanálků. AQP2 je uložen v cytoplazmatických oddílech a přemísťuje se do apikální membrány po stimulaci ADH, zatímco je AQP3



přítomný v bazoterální plazmatické membráně a jeho umístění není ovlivněno ADH, což bylo prokázáno u krys [47].

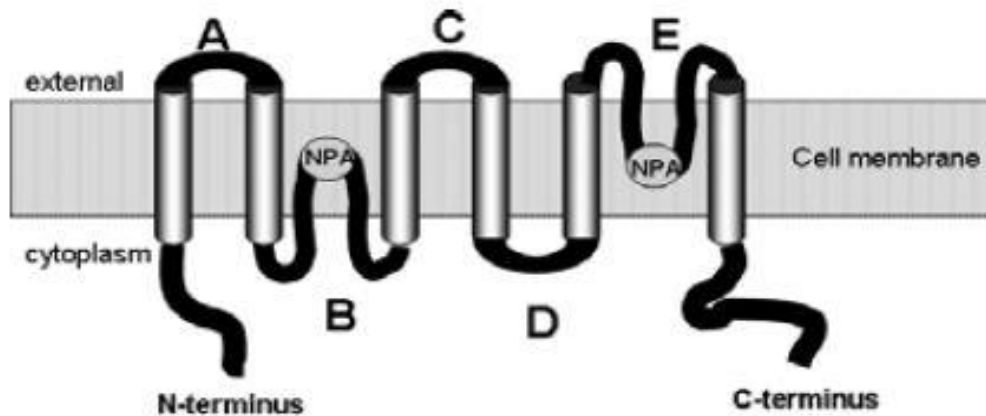
Mnohé důkazy ukazují, že AQP3 je důležitý ve funkci kůže. AQP3 má schopnost transportu vody a glycerolu uvnitř pokožky. Transportovaná voda pravděpodobně hraje roli v pokožkové hydrataci a hydrostatickém tlaku. Na druhou stranu se glycerol chová jako energetický zdroj pro vznik ATP, jako zdroj pro syntézu lipidů a fosfolipidů i jako osmoticky aktivní činidlo. Glycerol může být také použit fosfolipázou D pro syntézu fosfatidylglycerolu, potenciálního posla keratinocytové proliferace a diferenciaci [41].

#### **2.4.8 Aquaporin 4 – AQP4**

Aquaporin 4 je proteinový vodní kanál v plazmatické membráně, který je složen z 301 aminokyselin. Vyskytuje se v centrálním nervovém systému a především v astrocytech v mozku. Tam hraje hlavní roli ve vodní bilanci a absorpci draslíku. Také se aquaporin 4 podílí na tvorbě a kontrole otoku mozku a jiných nemocí jako je například nádor [11]. AQP4 má dvě izoformy, které se liší v délce N- konců. Isoforma s delším koncem je nazývána AQP4.M1 a s kratším AQP4.M23 [37].

##### **2.4.8.1 Struktura AQP4**

Aquaporin 4 je malý 30 kDa monomer. Je to hydrofobní transmembránový protein s cytosolickými amino- a karboxy- konci. Molekula protíná 6krát buněčnou membránu, tvoří 5 vymezených smyček. A, C a E smyčky na extracelulárním povrchu, B a D smyčky na intracelulárním povrchu. Hydrofóbní motiv asparginine-proline-alanine (NPA) je přítomný ve smyčkách B a E (obr. 12). Každý monomer se ohýbá do struktury, která formuje nezávislý vodní kanálek, charakterizovaný širokými vnějšími otvory a úzkým centrálním sevřením, kde NPA motivy monomerů vzájemně reagují. AQP4 monomery se shromažďují do tetramerů, ale všechny monomery jsou individuálně funkční. Pohyb vody skrz kanálky je řízen osmotickým gradientem přes membránu s omezeným průtokem podle velikosti omezení a elektrostatickým odpuzováním. Aquaporin 4 je zakotven do buněčné membrány astrocytů přes dystrofin proteinový komplex. Dystrofin-71 je hlavní komplex nalezený v mozku [33].



**Obr. 12: Struktura AQP4, (AQP4 má strukturu přesýpacích hodin a tvar vytvořený motivy NPA) [33]**

#### **2.4.8.2 Regulace funkce AQP4**

Rozmístění a počet molekul aquaporinu 4 v mozku je přísně regulován. Dlouhodobá regulace mozku je zajišťována pomocí vzájemně reagujících proteinů, hypoxií, osmolaritou, produkcí amoniaku a transkripčními informacemi. Krátkodobá regulace je nejčastěji zprostředkována receptory, které jsou vloženy v plazmatické membráně a které jsou spojeny s receptory G proteinů. Aktivátory těchto receptorů zahrnují peptidové hormony, prostanoidy, katecholaminy a aminokyseliny. Výsledkem této receptoro-ligandové vazby je fosforylace a defosforylace [36]. Zpětná fosforylace aquaporinu 4 spočívá v allosterických změnách v transportu proteinů důležitých pro membránovou dopravu a regulaci propustnosti AQP4. Bylo prokázáno, že kovy jako jsou rtuť, zinek a měď snižují propustnost AQP4 kvůli neznámému intracelulárnímu signálu v D smyčce. Existují spekulace, že by AQP4 mohl být v různých tkáních regulován vazopresinem [33].

### **2.5 Patofyziologie**

Poruchy funkce aquaporinů nebo jejich mutace jsou spojeny s několika lidskými nemocemi, jako je například vrozená katarakta nebo nefrogenní diabetes insipidus [42]. Nejčastěji vyskytující se nemoci jsou popsány v kapitole 2.5.1 až 2.5.5.

### 2.5.1 Katarakta a vady oka

Katarakta neboli šedý zákal může vzniknout z různých příčin jako například u diabetiků, působením radiačního záření nebo ve stáří, ale jednou z příčin také může být mutace genu aquaporinu 0. Je charakterizována zakalením čočky, člověk vidí zamlženě. Vrozená katarakta je obzvláště závažná, protože má potenciál pro inhibici zrakového vývoje, což vede k trvalé slepotě. Průhlednost čočky je přímý výsledek její vysoce uspořádané tkáně, nicméně údržba této struktury je závislá na kontrole hydratace a objemu jednotlivých buněk (viz kapitola 2.4.4). Buňky uvnitř čočky získávají potřebnou energii z anaerobní glykolýzy. Vlákná čočky se nachází hluboko uvnitř, nemohou přijmout dostatečnou výživu pasivní difúzí, a proto jsou závislé na dopravním systému integrálního membránového AQP0. Byli objeveni dva jedinci s vrozenou autozomálně dominantní kataraktou kvůli chybění jediné nukleotidové báze v čočce u AQP0 [20, 21, 50].

AQP1 a AQP4 se oba nachází v duhovce a v epitelu řasnatého tělíska a zastávají tam důležitou funkci v regulaci vodní bilance, čímž ovlivňují nitrooční tlak. Chybění AQP1 u myši, nebo nedostatek obou AQP1 a AQP4 ukazují významné poklesy v nitroočním tlaku, zejména kvůli redukci míry vylučování vodní komory z ciliárního epitelu. Zvýšení nitroočního tlaku je často spojováno s glaukomem, což vede k degeneraci optického nervu, ztrátě progresivního vizuálního pole a nakonec ke slepotě. Farmakologická léčba glaukomu neboli zeleného zákalu obvykle zahrnuje snížení nitroočního tlaku, buď snížením tvorby vodních komor, nebo zlepšením jejich výtoky přes trabekulární síťoviny a Schlemmův kanálek. Tudíž, inhibice aktivity aquaporinu 1 a aquaporinu 4 v oku může být alternativní metodou pro redukci nitroočního tlaku a výskyt glaukomu [22].

Vědci se shodli na faktu, že aquaporin 1 se vyskytuje v endoteliálních buňkách rohovky savců a podílí se na vylučování tekutiny z pojiva tkáně rohovky přes endotel. Také AQP5 se vyskytuje v epitelu rohovky a je důležitý pro transport tekutiny v těchto tkáních. Transparentnost a normální tloušťka rohovky je podmíněna hydratací a závisí na funkci aquaporinu 1 a aquaporinu 5. Tloušťka rohovky je zmenšena u myši postrádajících AQP1, což může být důležitý poznatek, pokud by se inhibice AQP1 používala terapeuticky. Na druhou stranu, tloušťka rohovky byla zvýšená u myši postrádající aquaporin 5, což může nabídnout další prostředky při započtení jakýchkoliv efektů inhibice AQP1. Kromě toho má AQP5 důležitou roli v tvorbě povrchové

tekutiny, která pomáhá ochránit rohovku před mechanickým poškozením a účinek tohoto vodního transportu může být přínosem v léčbě syndromu vyschlého oka [22].

### **2.5.2 Nefrogenní diabetes insipidus**

Nefrogenní diabetes insipidus (NDI) je onemocnění, při kterém pacienti vylučují velký objem zředěné moči, což vede k těžké dehydrataci a nerovnováze elektrolytů. Je to vzácná choroba rezistence na antidiuretický hormon. Pacienti mají věčnou žízeň a může dojít k mírné nebo závažné hypernatrémii jako důsledek neschopnosti ledvin zadržovat vodu. Zanedbání diagnózy tohoto genetického onemocnění u novorozenců může způsobit jejich psychické zpomalení či smrt v důsledku těžké hypernatrémie. Nefrogenní diabetes insipidus byl popsán jako X-recesivní dědičné onemocnění. NDI může být vrozený, související s genetickými abnormalitami nebo jako získaná porucha. V 90 % případů je X-recesivní znak mutací ve vazopresinovém receptoru 2. typu (V2) a 10 % je autozomálně recesivní v důsledku mutace aquaporinu 2. Byly objeveny tři mutace v AQP2 a všechny byly nalezeny na C-konci [5, 32, 39, 45].

### **2.5.3 Akumulace lipidů**

Aquaporin 7 patří do podskupiny aquaglycerporinů a lidský gen je zmapován na lokusu 9p13. V roce 1997 byl nalezen v tukové tkáni. AQP7 usnadňuje vylučování glycerolu a volných mastných kyselin po hydrolýze triacylglycerolu z adipocytů [50]. V poslední době byl proveden výzkum na starých myších, kterým chybí gen pro AQP7, u nichž se vyvinul nástup obezity a diabetes mellitus 2. typu. AQP7 je jedním z faktorů pro udržení kontroly hromadění lipidů v těle. Narušení AQP7 má za následek snížení propustnosti glycerolu skrz plazmatickou membránu tukových buněk, a tak dochází k akumulaci intracelulárního glycerolu. Vymizení AQP7 u myši je tedy způsobeno věkem [42].

### **2.5.4 Mozkový nádor**

Všechny maligní a mnoho benigních mozkových tumorů produkuje otok mozku v důsledku vad v endoteliálních těsných spojkách hematoencefalické bariéry a zvýšené přítomnosti angiogenických faktorů. Jsou konfliktní názory týkající se možného efektu regulace aquaporinu 4 v mozkových tumorech. Model mozkového tumoru ukázal, že myši bez aquaporinu 4 měly zvýšený nitrolební tlak a zrychlilo se onemocnění

ve srovnání s divokým typem myši. Což ukazuje, že AQP4 může být důležitý v ochraně proti tumorům vyvolaným otokem mozku. Na druhou stranu AQP4 by měl usnadnit rakovinné rozšíření díky buněčné migraci, což naznačuje, že inhibují zpomalený růst tumoru [33]. Vědci se shodují, že růst invazivního gliomu je citlivý na proteinovou kinázu C zprostředkující fosforylaci u aquaporinu 4. Fosforylace aquaporinu 4 blokuje vodní transport, což limituje růst tumoru. Tento výsledek byl podpořen nedávnou studií demonstrující, že siRNA snižující regulaci aquaporinu 4 zpomaluje proliferaci a invazivnost LN229 tumorových modelů [12].

### **2.5.5 Hypoalgie nedostatkem AQP4**

Stále více průzkumů dokázalo, že astrocyty hrají zásadní roli ve zpracování signálu bolesti do míchy. Místem, kde je obsaženo mnoho signalizačních molekul, které jsou spojené se synaptickým přenosem a modulací, jsou astrocyty. Oblastí bližšího zájmu jsou v současné době signalizační molekuly, které se podílí na procesu nocicepce. Nociceptory jsou receptory zprostředkující vnímání bolesti [7, 51]. Kromě nociceptorů je v astrocytech obsažen i AQP4, ovšem není v neuronech centrální nervové soustavy. Vzhledem k tomuto faktu jsou myši postrádající AQP4 ideální pro výzkum možných rolí AQP4 v nociceptivním zpracování. Experimenty prokázaly, že myši s nedostatkem AQP4 mají nižší práh bolesti. Reakce na termální a chemické stimulační se snížily, ovšem reakce na mechanické podněty zůstala stejná. Jako důsledek růstu prahu bolesti došlo k redukci počtu neuronových reakcí na škodlivé termální stimulační. Souhrnné výsledky naznačují, že důsledkem nedostatku AQP4 je hypoalgesie, tedy snížení prahu bolesti. Studie prokázaly, že AQP4 hraje důležitou roli v nociceptivním zpracování, a že dochází k rozšíření AQP4 v astrocytech, které se vyskytují po poranění míchy u potkanů a které následují centrální neuropatickou bolest. Vzhledem k tomu, že nedošlo k postižení lokomotorických aktivit nebo ke změně teploty pokožky, je možné, že bolestivé změny v chování lze přisoudit k funkční změně díky delecii genu AQP4 [3].

### **3. Závěr**

Aquaporiny jsou integrální transmembránové proteiny, které se nachází nejenom u člověka, ale také u rostlin a živočichů. Jsou důležité pro transport vody přes buněčnou membránu. V savčích buňkách bylo objeveno 13 různých izomerů. Aquaporiny se dělí do tří tříd. V první třídě jsou aquaporiny, které jsou propustné výhradně pro vodu, ve druhé třídě jsou aquaporiny propustné i pro malé neutrální molekuly, jako jsou glycerol, močovina a amoniak (proto jsou označovány jako aquaglycerporiny). Do třetí, nově objevené třídy patří supraaquaporiny, které se liší v sekvenci aminokyselinového motivu NPA.

Molekula aquaporinu je složena z jednoduchého peptidového řetězce, který se skládá ze zhruba 270 aminokyselin. Strukturu aquaporinů tvoří tetramer obsahující čtyři monomery. Monomer je tvořen šesti transmembránovými spirálami, které jsou zakončeny N- a C- konci.

Mezi nejvýznamnější aquaporiny patří aquaporin 2, který je jako jediný hormonálně regulován, a to antidiuretickým hormonem. Při mutaci aquaporinů může dojít k řadě onemocnění. Nejznámějším onemocněním je diabetes insipidus.

#### 4. Seznam literatury

1. Agre P., Kozono D.: *Aquaporin water channels: molecular mechanism for human diseases*. FEBS Letters, 2003, 555, p. 72-78.
2. Bai L., Fushimi K., Sasaki S., Marumo F.: *Structure of Aquaporin-2 vasopressin water channel*. The Journal of Biological Chemistry, 1996, 271, p. 5171-5176.
3. Bao F., Chen M., Zhang Y., Zhao Z.: *Hepoalgnesia in mice lacking aquaporin-4 water channels*. Brain Research Bulletin, 2010, 83, p. 298-303.
4. Benga G.: *On the definition, nomenclature and classification of water channel proteins (aquaporins and relatives)*. Molecular Aspects of Medicine, 2012, 33, p. 514-517.
5. Birnbaumer M.: *Vasopressin Receptor Mutations and Nephrogenic Diabetes Insipidus*. Archives of Medical Research, 1999, 30, p. 465-474.
6. Bouley R., Hawthorn G., Russo L. M., Lin H. Y., et al.: *Aquaporin 2 (AQP2) and vasopressin type 2 receptor (V2R) endocytosis in kidney epithelial cells: AQP2 is located in „endocytosis-resistant“ membrane domains after vasopressin treatment*. Biology of the cell, 2006, 4, p. 215-232.
7. Bradesi S.: *Role of spinal cord glia in the central processing of peripheral pain perception*. Neurogastroenterol Motil, 2010, 5, p. 499-511.
8. Castle N. A.: *Aquaporins as targets for drug discovery*. Drug Discovery Today, 2005, 10, p. 485-493.
9. Clapham D. E.: *Symmetry, selectivity and the 2003 Nobel prize*. Cell Press, 2003, 115, p. 641-646.
10. Devuyt O., Yool A. J.: *Aquaporin-1: New developments and perspectives for peritoneal dialysis*. Peritoneal Dialysis International, 2010, 30, p. 135-141.
11. Ding T., Gu F., Fu L., Ma Y. J.: *Aquaporin-4 glioma invasion and an analysis of molecular mechanism*. Journal of Clinical Neuroscience, 2010, 17, p. 1359-1361.
12. Ding T., Ma Y., Li W., Liu X., et al.: *Role of aquaporin-4 in the regulation of migration and invasion of human glioma cells*. International Journal of Oncology, 2011, 38, p. 1521-1531.
13. Edemir B., Pavenstädt H., Schlatter E., Weide T.: *Mechanism of cell polarity and aquaporin sorting in the nephron*. Pflugers Arch – Eur J Physiol, 2010, 461, p. 607-621.

14. Engel A., Fujiyoshi Y., Gonen T., Walz T.: *Junction-forming aquaporins*. Current Opinion in Structural Biology, 2008, 18, p. 229-235.
15. Eriksson U. K., Fischer G., Friemann R., Enkavi G., et al.: *Subangstrom resolution X-Ray structure details Aquaporin-water interactions*. Science, 2013, 340, p. 1346-1349.
16. Fallick C., Sobotka P. A., Dunlap M. E.: Sympathetically mediated changes in capacitance: Redistribution of the venous reservoir as a cause of decompensation. Journal of the American Heart Association, 2011, 4, p. 669-675.
17. Fu D., Lu M.: *The structural basis of water permeation and proton exclusion in aquaporins*. Molecular Membrane Biology, 2007, 24, p. 366-374.
18. Fukuda M., Naka M., Mizokami J., Negi A., et al.: *Diabetes induces expression of aquaporin-0 in the nerve fibers of spontaneously diabetic Torii rats*. Experimental Eye Research, 2011, 92, p. 195-201.
19. Groot B. L., Grubmüller H.: *The dynamics and energetics of water permeation and proton exclusion in aquaporins*. Current Opinion in Structural Biology, 2005, 15, p. 176-183.
20. Hejtmanick J. F.: *Congenital cataracts and their molecular genetics*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2008, 19, p. 134-149.
21. Huang B., He W.: *Molecular characteristics of inherited congenital cataracts*. European Journal of Medical Genetics, 2010, 53, p. 347-172.
22. Huber V. J., Tsujita M., Nakada T.: *Aquaporins in drug discovery and pharmacotherapy*. Molecular Aspects of Medicine, 2012, 33, p. 691-703.
23. Chen Y. F.: *Atrial natriuretic peptide in hypoxia*. Peptides, 2005, 26, p. 1068-1077.
24. Christensen B. M., Zelenina M., Aperia A., Nielsen S.: Localization and regulation of PKA-phosphorylated AQP2 in response to V2-receptor agonist/antagonist treatment. Am J Physiol Renal Physiol, 2000, 278, p. 29-42.
25. Iandiev I., Pannicke T., Härtig W., Grosche J., et al.: *Localization of aquaporin-0 immunoreactivity in the rat retina*. Neuroscience Letters, 2007, 426, p. 81-86.
26. Jabor A. a kolektiv: *Vnitřní prostředí*. Grada Publishing, 2008, p. 165-172.
27. Jensen M., Park S., Tajkhorshid E., Schulten K.: *Energetics of glycerol conduction through aquaglyceroporin GlpF*. National Academy of Sciences, 2002, 99, p. 6731-6736.



28. King S. L., Yasui M., Agre P.: *Aquaporins in health and disease*. Molecular Medicine Today, 2000, 6, p. 60-65.
29. Kittnar O., Mlček M.: *Atlas fyziologických regulací*. Grada Publishing, 2009, p. 206-208.
30. Kozono D., Yasui M., King L. S., Agre P.: *Aquaporin water channels: Atomic structure and molecular dynamics meet clinical medicine*. J Clin Invest, 2002, 109, p. 1395-1399.
31. Kumari S. S., Eswaramoorthy S., Mathias R. T., Varadaraj K.: *Unique and analogous functions of aquaporin 0 for fiber cell architecture and ocular lens transparency*. Biochimica et Biophysica Acta, 2011, 1812, p. 1089-1097.
32. Kuwahara M., Iwai K., Ooeda T., Igarashi T., et al.: *Three families with autosomal dominant nephrogenic Diabetes insipidus caused by Aquaporin-2 mutation in the C-Terminus*. Am. J. Hum. Genet., 2001, 69, p. 738-748.
33. Lacovetta Ch., Rudloff E., Kirby R.: *The role of aquaporin 4 in the brain*. Veterinary Clinical Pathology, 2012, 41, p. 32-44.
34. Li H., Chen H., Steinbronn Ch., Wu B., et al.: *Enhancement of proton conductance by mutations of the selectivity filter of Aquaporin-1*. J. Mol. Biol., 2011, 407, p. 607-620.
35. MacDougald O. A., Burant Ch.: *Obesity and metabolic perturbations after loss of aquaporin 7, the adipose glycerol transporter*. The National Academy of Sciences of the USA, 2005, 102, p. 10759-10760.
36. Madrid R., Maout S. L., Barrault M. B., Janvier K., et al.: *Polarized trafficking and surface expression of the AQP 4 water channel are coordinated by serial and clathrin-adaptor complexes*. The EMBO Journal, 2001, 24, p. 7008-7021.
37. Mitsuma T., Tani K., Hiroaki Y., Kamegawa A., et al.: *Influence of the cytoplasmic domains of Aquaporin-4 on water conduction and array formation*. J. Mol. Biol., 2010, 402, p. 669-681.
38. Németh-Cahalan K. L., Kalman K., Hall J. E.: *Molecular basis of pH and Ca<sup>2+</sup> regulation of Aquaporin water permeability*. The Journal of General Physiology, 2004, 123, p. 573-580.
39. Nosset A. Y., Fröhlich M., Mertina R. M., Knoers N. V. A. M., et al.: *Plasma levels of von Willebrand factor, von Willebrand factor propeptide and factor VIII in carriers and patients with nephrogenic Diabetes insipidus*. Thrombosis Research, 2010, 125, p. 554-556.

40. Ohta E., Itoh T., Nemoto T., Kumagai J., et al.: *Pancreas-specific aquaporin 12 null mice showed increased susceptibility to caerulein-induced acute pancreatitis*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009, 297, p. 1368-1378.
41. Qin H., Zheng X., Zhong X., Shetty A. K., et. al.: *Aquaporin-3 in keratinocytes and skin: Its role and interaction with phospholipase D2*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2011, 508, p. 138-143.
42. Rodríguez A., Catalán V., Gómez-Ambrosi J., Frühbeck G.: *Role of aquaporin-7 in the pathophysiological control of fat accumulation in mice*. *FEBS Letters*, 2006, 580, p. 4771-4776.
43. Sasaki S.: *Aquaporin 2: From its discovery to molecular structure and medical implications*. *Molecular Aspects of Medicine*, 2012, 33, p. 535-546.
44. Silbernagl S., Despopoulos A.: *Atlas fyziologie člověka*. Grada Publishing, 2004, p. 148-185.
45. Sindhvani A., Singhal D., Jerath N.: *Nephrogenic Diabetes insipidus*. *Apollo Medicine*, 2007, 4, p. 149-151.
46. Sui H., Han B. G., Lee J. K., Walian P., et al.: *Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel*. *Nature*, 2001, 414, p. 872-878.
47. Takata K., Matsuzaki T., Tajika Y.: *Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane*. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 2004, 39, p. 1-83.
48. Tong J., Canty J. T., Briggs M. M., McIntosh T. J.: *The water permeability of lens aquaporin-0 depends on its lipid bilayer environment*. *Experimental Eye Research*, 2013, 113, p. 32-40.
49. Umale S., Deck C., Bourdet N., Dhumane P., et al.: *Experimental mechanical characterization of abdominal organs: liver, kidney & spleen*. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 2013, 17, p. 22-33.
50. Vadaraj K., Kumari S. S., Patil R., Wax M. B., Mathias R. T.: *Functional characterization of a human aquaporin 0 mutation that leads to a congenital dominant lens cataract*. *Experimental Eye Research*, 2008, 87, p. 9-21.
51. Verkman A. S., Binder D. K., Bloch O., Auguste K., et al.: *Three distinct roles of aquaporin-4 in brain function revealed by knockout mice*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, 1758, p. 1085-1093.
52. Ward J. P. T., Linden R. W. A.: *Základy fyziologie*. Galén, 2010, p. 70-81.

53. Wootton P.: *Aquaporin membrane proteins*. Science Photo Library, 2013, 8348, p. 1.
54. Xu G. Y., Wang F., Jiang X., Tao J.: *Aquaporin 1, a potential therapeutic target for migraine with aura*. Molecular Pain, 2010, 6, p. 6-68.
55. Yakata K., Hiroaki Y., Ishibashi K., Sohara E., et al.: *Aquaporin-11 containing a divergent NPA motif has normal water channel activity*. Biochimica et Biophysica Acta, 2007, 1768, p. 688-693.
56. Yasui M.: *Molecular mechanism and drug development in aquaporin water channel diseases: Structure and function of Aquaporins*. J Pharmacol Sci, 2004, 96, p. 260-263.