

# Akvaporini

---

**Batković, Michaela**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:086953>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-20**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijски odsjek

Michaela Batković

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **Akvaporini**

## **Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Morana Dulić

Zagreb, 2020.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

10. svibnja 2020.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

25. rujna 2020.

Mentor rada: doc. dr. sc. Morana Dulić

Potpis:



## Sadržaj

<b>§- SAŽETAK .....</b>	<b>VII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Struktura.....</b>	<b>2</b>
2.1.1. Primarna, sekundarna, tercijarna i kvaterna struktura akvaporina.....	2
2.1.2. Struktura akvagliceroporina .....	4
<b>2.2. Selektivnost .....</b>	<b>5</b>
2.2.1. Selektivni filter .....	5
2.2.2. Nepropusnost protona.....	6
2.2.3. (Ne)propusnost iona.....	7
2.2.4. Molekule plinova.....	8
<b>2.3. Regulacija .....</b>	<b>8</b>
2.3.1. Strukturni mehanizmi .....	9
2.3.2. Hormonska regulacija.....	10
2.3.3. Posttranslacijske modifikacije .....	11
2.3.4. Organizacija akvaporina .....	11
<b>2.4. Akvaporini kod čovjeka.....</b>	<b>12</b>
<b>2.5. Akvaporini kod biljaka.....</b>	<b>13</b>
<b>2.6. Uloga akvaporina u razvoju potencijalnih terapeutika.....</b>	<b>14</b>
<b>§ 3. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>XVII</b>



## §- Sažetak

Otkriće akvaporina uvelike je pridonijelo razumijevanju transporta jednog od najvažnijih nutrijenata u živom svijetu-vode. Nobelova nagrada za kemiju dodijeljena Peteru Ageru 2003. godine za otkriće akvaporina potvrđuje njihovu važnu ulogu u homeostazi vode. Akvaporini su hidrofobni transmembranski kanali pronađeni u svim staničnim membranama. Omogućuju brzi protok primarno molekula vode te nekih manjih molekula kao što su ureja, amonijak i glicerol kroz polupropusnu membranu i shodno tomu dijele se u dvije skupine: akvaporine i akvagliceroporine. Predstavljaju glavni selektivni put vode kroz membranu kako biljne, tako i životinjske stanice. Postižu izuzetno veliki obrtni broj transporta koji iznosi  $10^{-9} \text{ s}^{-1}$ . Odlika ove obitelji membranskih proteina je selektivnost prema vodi i nepropuštanje  $\text{H}_3\text{O}^+$  čime je očuvan elektrokemijski gradijent preko stanične membrane.<sup>1</sup>





## § 1. UVOD

Stanica svoju ravnotežu održava propuštanjem molekula i iona preko membrane. Stanična membrana fosfolipidni je dvosloj koji je zbog gustog pakiranja uglavnom nepropustan za većinu otopljenih tvari, dok u velikom postotku propušta polarne molekule vode. Ovo svojstvo od velike je važnosti u stanicama koje brzo moraju propustiti veću količinu vode, npr. stanice oka i bubrega. Ioni i molekule, kao što su kalijevi i natrijevi ioni te molekule glukoze, prelaze membranu putem odgovarajućih membranskih kanala i prenositelja pasivnim ili aktivnim prijenosom. Za molekule vode dugo se pretpostavljalo da prelaze membranu samo osmozom, pasivnom difuzijom u smjeru koncentracijskog gradijenta. Međutim, propusnost molekula vode puno je veća od one koju predviđa ova pretpostavka.<sup>2</sup> Otkriće akvaporina znatno je pridonijelo objašnjenju permeabilnosti stanične membrane prema vodi i održavanju homeostaze vode. Kod čovjeka opisano je 13 vrsta akvaporina, dok je ta brojka nešto viša kod biljaka i životinja. Veliki broj različitih akvaporina ide u prilog različitim potrebama staničnih odjeljaka za vodom. Ovaj rad osvrnut će se na specifičnu građu i funkciju akvaporina, kontrolu selektivnosti, čimbenike koji utječu na aktivnost te njihov biološki značaj.

Tablica 1. Akvaporni kod čovjeka

akvaporin	lokacija	akvaporin	lokacija
AQP0	leća oka	AQP7	adipociti, testisi, miokard
AQP1	eritrociti, bubrezi, tumorske stanice	AQP8	crijeva
AQP2	bubrezi	AQP9	hepatociti, eritrociti
AQP3	bubrezi, epiderma, T-stanice, eritrociti	AQP10	crijeva
AQP4	bubrezi, mišići, uho, dišni putevi, neke moždane stanice	AQP11	jetra, testisi, bubrezi
AQP5	žlijezde znojnice, žlijezde slinovnice	AQP12	gušterača
AQP6	bubrezi		

## § 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

### 2.1. Struktura

#### 2.1.1. Primarna, sekundarna, tercijarna i kvaterna struktura akvaporina

Akvaporini su mali, vrlo hidrofobni proteini. Ostvaruju jake hidrofobne interakcije s lipidima unutar membrane, stoga se svrstavaju u integralne membranske proteine. Njihova specifična struktura, koja je očuvana među različitim akvaporinima, iako do nje svaki od akvaporina dolazi drugim putem sklapanja, objašnjava njihova svojstva. Analizom njihove primarne strukture utvrđena je očuvanost motiva koja uključuje dvije sekvence „Asn-Pro-Ala“ (NPA), jednu sekvencu „Ala-Glu-Phe-Leu“ (AEFL) bliže N-kraju i jednu sekvencu bliže C-kraju molekule monomera kao što je prikazano na Slici 1. Također, prisutna je homologija između dviju polovica molekule monomera što ukazuje da je tijekom evolucije akvaporina došlo do udvostručavanja gena. Jedna polovina monomera akvaporina je glikolizirana, ali ta činjenica nije od važnosti za funkciju akvaporina.<sup>3</sup>

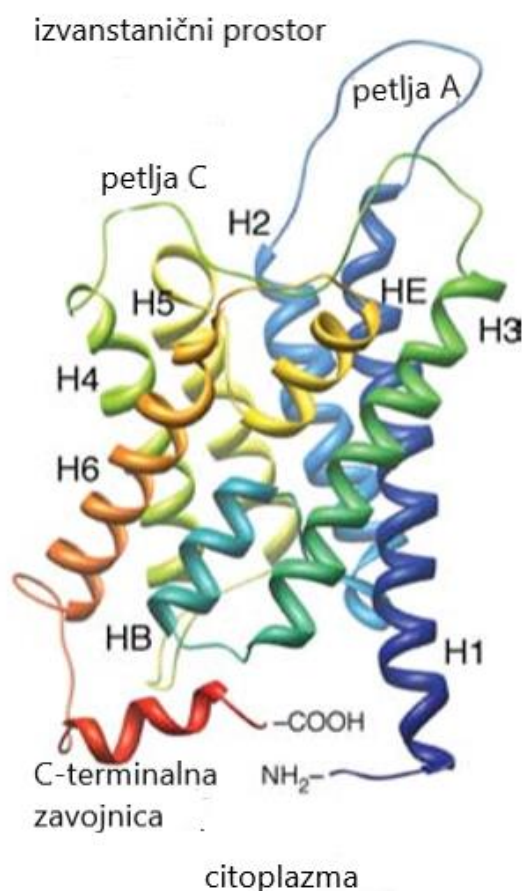


Slika 1. Primarna struktura akvaporina (preuzeto iz ref.3)

Za proteine koji se nalaze u hidrofobnom okruženju svojstvena je tendencija formiranja struktura u kojima dolazi do ostvarivanja velikog broja nevezanih interakcija kao što su  $\alpha$ -zavojnice i  $\beta$ -strukture. Monomer akvaporina sastoji se od 6  $\alpha$ -zavojnica, a one su međusobno povezane petljama.

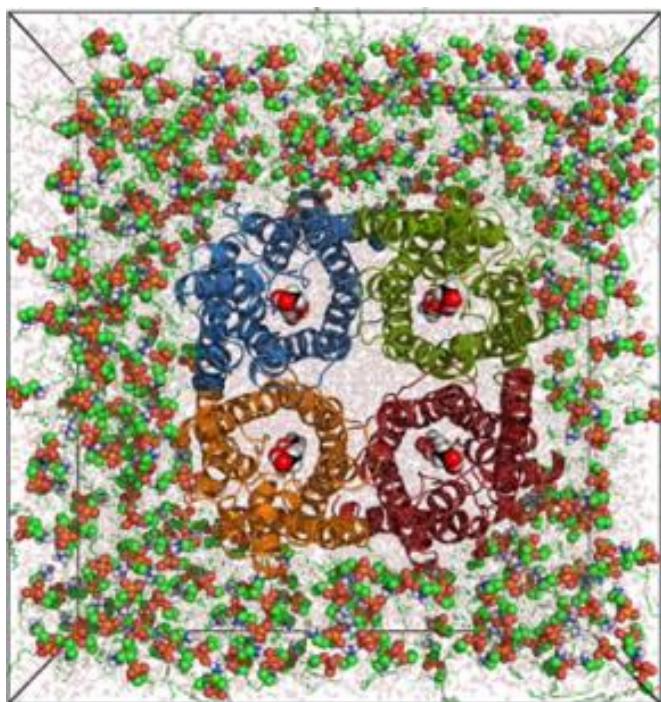
Tercijarna struktura akvaporina ima oblik bačve. Struktura se može podijeliti na dvije domene koje su strukturno slične jedna drugoj, što je vidljivo iz primarne strukture proteina, a jedna u odnosu na drugu je rotirana za  $180^\circ$ . Prva domena započinje N-krajem polipeptida, orijentiran prema citoplazmi stanice, i slijede ga zavojnice H1 i H2 povezane petljom A. Na petlji A nalazi se specifično mjesto glikolizacije. Na citoplazmatski kraj zavojnice H2

nastavlja se petlja B koja ulazi u membransku regiju smještajući motiv „Asn-Pro-Ala“ u sredinu strukture akvaporina, a zatim oblikujući zavojnicu HB izlazi na površinu koja gleda prema citoplazmi. Na nju se nastavlja zavojnica H3. Druga domena, suprotno orijentirana od prve domene, započinje zavojnicom H4 na strani koja gleda prema izvanstaničnom prostoru te je s prvom domenom premoštena petljom C koja se nastavlja na zavojnicu H3. Zavojnica H4 prolazi kroz membranu, a na nju se na citoplazmatskoj strani nastavlja petlja D koja ju spaja sa zavojnicom H5. Petlja E nastavlja se na zavojnicu H5, ulazi u membranski prostor smještajući motiv „Asn-Pro-Ala“ okomito na isti motiv koji je dio petlje B iz prve domene te naposljetku oblikuje kratku zavojnicu HE na koju se nastavlja zavojnica H6. C-kraj polipeptida, kao i N-kraj, orijentiran je prema citoplazmi. Struktura je stabilizirana neveznim interakcijama između glicina koji se nalaze na zavojnicama i ionskim interakcijama između nabijenih aminokiselina. Petlje B i E su na okupu zahvaljujući van der Waalsovima interakcijama između prolina iz konzerviranih motiva „Asn-Pro-Ala“ koji zatvaraju približno kut od 90°, a asparagin iz istih sekvenci sudjeluje u vodikovim vezama s aminoskupinama iz glavnog lanca polipeptida.



Slika 2. Tercijarna struktura akvaporina ( preuzeto i prilagođeno iz ref.4)

Iako monomer tvori funkcionalan kanal, akvaporini su u staničnoj membrani organizirani kao homotetrameri. (Slika 3.) Monomeri su simetrično okupljeni oko osi simetrije četvrtog reda koja je polegnuta okomito na membranu. Svaki od monomera je u interakciji s dva susjedna monomera. Stabilnosti strukture pridonose vodikove veze između zavojnica različitih monomera kao i interakcija između petlji. Svaki od monomera sudjeluje u transportu vode. Za centralnu poru koju formiraju monomeri u prostoru nije dokazano da sudjeluje u prijenosu molekula vode.<sup>5</sup>

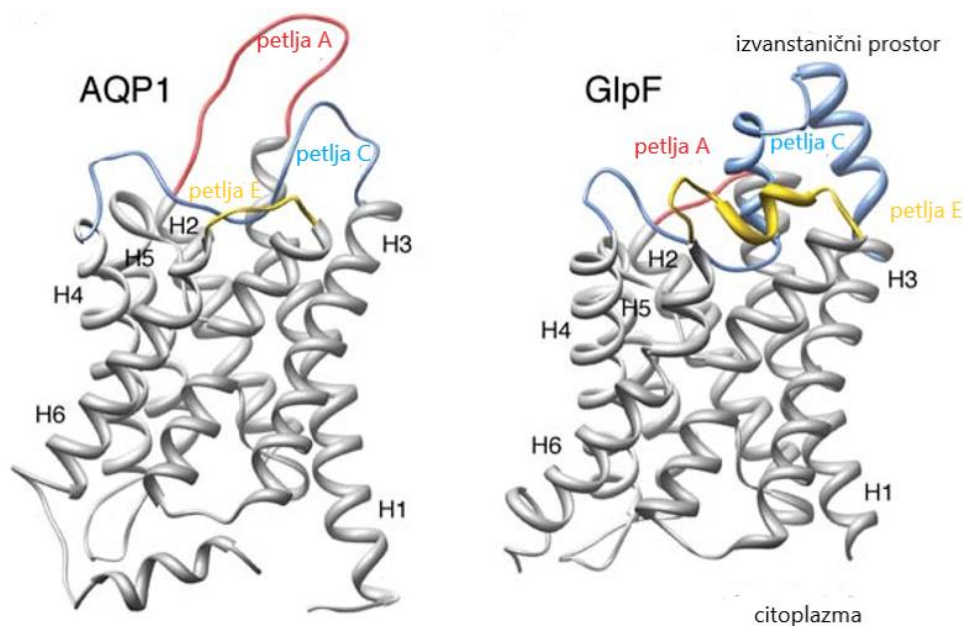


Slika 3. Kvaterna struktura akvaporina odozgo (preuzeto iz ref.6): simetrično organizirani monomeri(plavo,zeleno, narančasto, crveno) u fosfolipidnom okruženju; molekule vode smještene su duž centralne osi svakog od monomera

### 2.1.2. *Struktura akvagliceroporina*

Akvagliceroporini su akvaporini koji uz vodu propuštaju manje molekule kao što su glicerol, amonijak, ureja. Strukturno su vrlo slični akvaporinima. Glavna razlika u strukturi odnosi se na izvanstanične petlje A i C. Kod akvagliceroporina petlja A je kraća u usporedbi s onom u akvaporinu. Petlja C kod akvaporina „leži“ na površini orijentiranoj prema izvanstaničnom prostoru, dok je kod akvagliceroporina ista duža i formira motiv „zavojnica-okret-zavojnica“. Petlja E u akvagliceroporinima je duža i formira zavojnicu s jednim okretom. Pošto akvagliceroporini propuštaju nepolarnije i veće molekule od vode, njihove pore moraju biti

šire i hidrofobnije. Ti uvjeti su postignuti zamjenom polarnih i razgranatih aminokiselina s onima hidrofobnijim i manje razgranatim.



Slika 4. Struktura monomera akvaporina(lijevo) i akvagliceroporina(desno) (preuzeto i prilagođeno iz ref.4)

## 2.2. Selektivnost

### 2.2.1. Selektivni filter

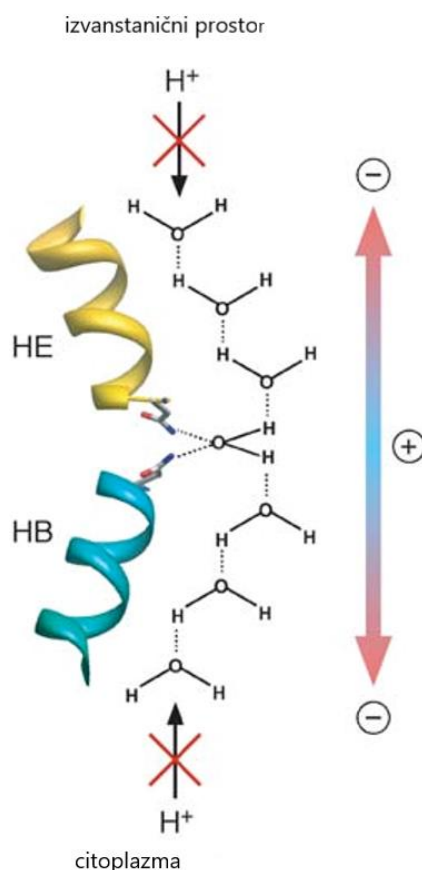
Kao što je već rečeno, ovisno o hidrofobnosti unutrašnjosti kanala i steričkim smetnjama, akvaporini mogu selektivno propuštati samo molekule vode ili i dodatne neutralne molekule. Kanal se može podijeliti na tri dijela: ulaz u obliku lijevka s citoplazmatske strane, suženje sa selektivnim filterom i širenje kanala u obliku lijevka prema izvanstaničnom prostoru. Na ulazu u kanal prevladavaju aminokiseline s polarnim ograncima što osigurava dominantan ulaz vode u kanal. Suženje kanala je hidrofobno s hidrofилnim regijama na jednoj strani kanala koje tvore kisikovi atomi karbonilnih skupina glavnog lanca polipeptida i dušikovi atomi amidnih skupina koje ulaze u sastav bočnog ogranka asparagina iz NPA motiva. Unutar suženja nalazi se ar/R selektivni filter čija je uloga selektivno propustiti supstrat. Selektivni filter je regija u čiji sastav uvijek ulazi neka aromatska aminokiselina i arginin. Filter je hidrofobne prirode s hidrofилnim regijama koje omogućavaju interakciju s trima molekulama vode. Pozitivni naboj selektivnog filtera, zahvaljujući argininu i histidinu koji ulaze u njegov sastav, te njegov mali promjer omogućavaju prolazak samo molekula vode. Iako nije velika

razlika u strukturi filtera akvaporina i akvagliceroporina, zamjenom jedne ili dvije aminokiseline mijenja se hidrofobnost i širina kanala te je, uz vodu, omogućen prolazak i drugih molekula. Konkretno kod AQP1, zamjenom histidina s glicinom oslobađa se dio prostora u kanalu i omogućena je dodatna supstitucija cisteina s hidrofobnijim fenilalaninom te dodatnog fenilalanina s većim triptofanom. Uz to, uklanjanje pozitivnog naboja s ar/R selektivnog filtera uzrokuje djelomično propuštanje protona.<sup>4</sup>

### 2.2.2. *Nepropusnost protona*

Akvaporini načelno ne propuštaju ione čime je očuvan elektrokemijski gradijent. Narušavanje istoga dovelo bi do poremećaja u prenošenju signala u i izvan stanice. U vodenom mediju eksperimentalna molarna provodnost oksonijevog iona veća je od one koju predviđa teorija, što je posljedica difuzije protona kroz mrežu molekula vode ili drugih molekula povezanih vodikovim vezama. Taj proces poznat je pod nazivom Grotthusov mehanizam. Međutim, prijenos oksonijevog iona je onemogućen kroz kanale akvaporina zahvaljujući njegovoj strukturi. Molekule vode kroz kanal prolaze u koloni. Kada uđe u suženje, pojedina molekula vode gubi od dvije do četiri vodikove veze koje je gradila sa susjednim molekulama vode prije ulaska u isti. Uz preostale dvije vodikove veze s molekulom vode prije i nakon nje u koloni, promatrana molekula vode gradi vodikove veze s aminokiselinama unutar suženja.<sup>8</sup> Sve molekule vode, osim centralne, donori su vodikove veze. Centralna molekula vode u suženju ostvaruje vodikove veze preko kisikovog atoma s dvije molekule asparagina iz NPA sekvenci, stoga su njegovi nevezni elektronski parovi nedostupni za stvaranje vodikovih veza sa susjednim molekulama vode.<sup>9</sup> Prekidom uređene mreže vodikovih veza između molekula vode onemogućen je prijenos protona. Proton bi, u najboljem slučaju, mogao doći samo do centralne molekule vode. Male zavojnice koje su prisutne u petljama B i E ne prolaze kroz membranu, nego se nalaze u unutrašnjosti kanala i stvaraju električni dipol s pozitivnim nabojem u ravnini s NPA sekvencama i negativnim nabojima orijentiranim prema izlazima u citoplazmu i izvanstanični prostor. Spomenuti dipol je odgovoran za pravilnu orijentaciju centralne molekule vode kao što je prikazano na Slici 5. Pravilnoj orijentaciji centralne molekule vode pridonosi i hidrofobna regija koja se nalazi nasuprot NPA sekvencama.





Slika 5. Orijentacija molekula vode unutar suženja ( preuzeto i prilagođeno iz ref.4)

Posljedično, dipol je odgovoran i za orijentaciju ostalih molekula u kanalu. Na temelju položaja centralne molekule vode, susjedne molekule orijentiraju se tako da s njom mogu ostvariti vodikove veze. Ta činjenica objašnjava suprotnu orijentaciju molekula vode u citoplazmatskoj i izvanstaničnoj polovici kanala. Ovakva orijentacija omogućuje transport vode u oba smjera.

### 2.2.3. (Ne)propusnost iona

Ioni su u vodenom mediju hidratizirani. Da bi prošli kroz kanal, ioni se moraju osloboditi hidratacijske ljuske i narušene veze nadomjestiti novim interakcijama s aminokiselinama unutar kanala. Budući da je mnoštvo takvih interakcija s molekulama vode, nije ih sve moguće nadomjestiti interakcijama koje su na raspolaganju unutar kanala. Sve i da kation dođe u suženje kanala, ne bi prošao kroz kanal zbog pozitivnog naboja u središtu koji generiraju poluzavojnice. Anione bi odbijali parcijalni negativni naboji kisikovih atoma iz karbonilnih skupina duž glavnog polipeptidnog lanca. Ipak, ima slučajeva kada humani APQ1 i APQ6 propuštaju ione. Kationi prolaze kroz centralnu poru APQ1 kao odgovor na



oslobađanje cGMP koji aktivira tirozin-kinazu. Aktivirani enzim fosforilira Tyr na C-kraju proteina što uzrokuje pomak položaja petlje D. S druge strane, vezanjem  $Hg^{2+}$ , inače inhibitora svih akvaporina, na Cys190 AQP6-a dolazi do aktivacije AQP6 i uspostave protoka aniona. Na citoplazmatskom ulazu svakog od monomera nalazi se pozitivno nabijena aminokiselina Lys72 koja je odgovorna za selektivnost aniona. U skladu s tim otkrićem, postoji nova podjela akvaporina, na one ortodoksne i neortodoksne.<sup>7</sup> Akvaporini koji su visoko permeabilni samo prema vodi nazivaju se ortodoksnim akvaporinima i ubrajaju se u transportere s najbržim obrtnim brojem. Ukoliko uz molekule vode propuštaju i druge vrste, kao što su ioni, nazivaju se neortodoksnim akvaporinima. Ranije spomenuti akvagliceroporini također su podvrsta neortodoksnih akvaporina, kao i metaloidoporini koji se susreću kod biljaka.

#### 2.2.4. Molekule plinova

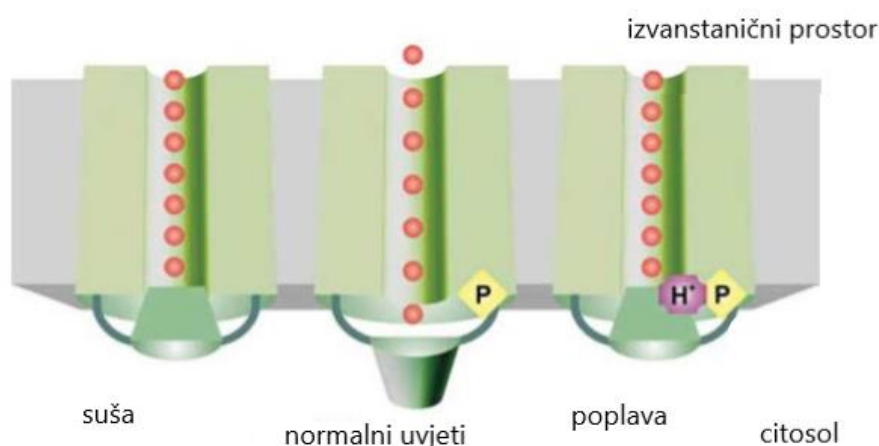
Molekule ugljikovog dioksida i kisika su male nepolarne molekule koje difundiraju kroz staničnu membranu. Neka istraživanja ukazuju na mogućnost da se njihov transport preko membrane odvija i putem akvaporina. Primijećeno je da eukariotske stanice s akvaporinima i mioglobinom bilježe pojačanu oksidaciju deoksimioglobina u oksimioglobin u usporedbi s kontrolnim stanicama bez akvaporina. Biljke koje su bile određeni interval vremena u uvjetima hipoksije ne pokazuje nikakve posljedice u usporedbi s kontrolnim biljkama. Nadalje, promatranjem biljne stanice s akvaporinima čija je aktivnost utišana pomoću živinog(II) klorida, uočena je smanjena stopa fotosinteze, dok ekspresija humanih akvaporina u oocitama povećavaju permeabilnost  $CO_2$ . Ovo područje nedovoljno je istraženo, ali se pretpostavlja da glavnu ulogu u transportu  $CO_2$  i  $O_2$  ima centralna pora koju formiraju simetrično organizirani monomeri u homotetrameru.<sup>10,11</sup>

### 2.3. Regulacija

Svi akvaporini sintetizirani su u endoplazmatskom retikulumu. Kako bi dospjeli do ciljne destinacije, potrebni su neki mehanizmi i signalni putevi. Transport molekula kroz akvaporine također je reguliran kako bi njihova aktivnost odgovarala fiziološkim potrebama.

### 2.3.1. Strukturni mehanizmi

Postoji nekoliko načina reverzibilnih strukturnih promjena koji utječu na permeabilnost akvaporina prema vodi. Akvaporini viših eukariota regulirani su osmolarnošću, fosforilacijom i promjenom pH. Biljke su razvile mehanizme kojima se suočavaju s rapidnim promjenama u dostupnosti vode. Za vrijeme suše zatvaranje pore akvaporina SoPIP2;1 u špinatu, primjerice, regulirano je defosforilacijom očuvanih serinskih ostataka Ser115 i Ser274 na petlji D, a za vrijeme poplave protoniranjem očuvanog histidinskog ostatka His193 na istoj petlji. (Slika 6.) Nadalje, postulirano je da  $\text{Ca}^{2+}$  ioni sudjeluju u regulaciji i inhibiciji akvaporina *in vivo*.<sup>15</sup>



Slika 6. Utjecaj (de)fosforilacije na aktivnost biljnih akvaporina (preuzeto i prilagođeno iz ref.15)

Petlja D kod ovih akvaporina duža je u usporedbi s ostalima iz PIP (*plasma membrane intrinsic proteins*) skupine akvaporina. U zatvorenoj konformaciji petlja D je smještena ispod akvaporina s citosolne strane i začepљуje poru hidrofobnom regijom koju čini Leu197 u kombinaciji s His99, Val104 i Leu108. Aminokiseline petlje D orijentirane su prema N-kraju s kojima tvore vodikove veze. Kation  $\text{Ca}^{2+}$  koordiniran je aminokiselinama N-kraja proteina i stabilizira interakciju petlje D i N-kraja proteina preko mreže ionskih i vodikovih veza. Kation  $\text{Ca}^{2+}$  u fosforiliranom proteinu ima nešto drugačiju koordinaciju. Uz O-atome Asp28 i Glu31, u kontaktu je i s fosfatnom skupinom Ser115 što uzrokuje njegov pomak prema periferiji tetramera. Posljedično, narušen je položaj Glu31 te na kraju i vodikova mreža između petlje D i N-kraja proteina. Petlja D je tako udaljena od citoplazmatskog ulaza u poru te akvaporin prelazi iz zatvorene u otvorenu konformaciju.

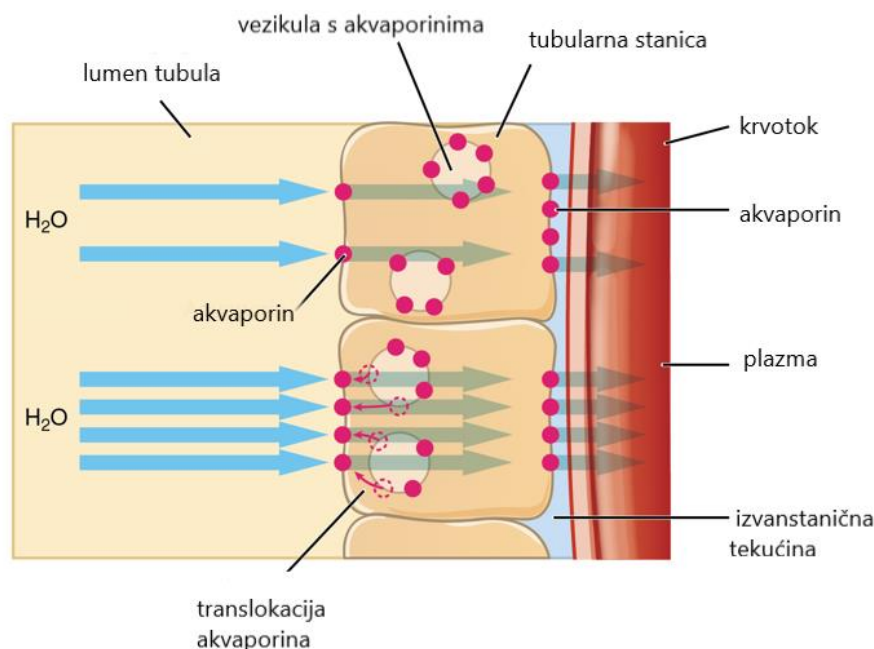
Za vrijeme poplave otvorena konformacija akvaporina protoniranjem His193 prelazi u zatvorenu konformaciju. Pri niskom pH, rotacija protoniranog histidinskog ostatka omogućuje

uspostavu solnog mosta između His193 i Asp28 čime je stabilna konformacija proteina regenerirana.

### 2.3.2. Hormonska regulacija

Hormonska regulacija uglavnom podrazumijeva usmjeravanje akvaporina iz unutrašnjosti stanice u staničnu membranu. Antidiuretički hormon ADH regulira homeostazu vode u bubrezima. Osmolarnost plazme definiran je kao omjer količine otopljene tvari i vode u krvnoj plazmi. Dehidracijom osmolarnost se povećava što detektiraju osmoreceptori u hipotalamusu i oslobađa se ADH. ADH se veže za receptore na stanicama bubrega inicirajući oslobađanje cAMP-a koji aktivira protein-kinazu. Fosforilacija potiče kretanje vezikula, u kojima su uskladišteni akvaporini, od Golgijevog aparata prema staničnoj membrani. Umetanjem dodatnih akvaporina u membranu potiče se reapsorpcija vode iz filtrata, koji bi trebao izaći iz organizma kao urin i regenerira odgovarajuća koncentracija i volumen krvi unutar organizma.<sup>16</sup>

ADH odgovoran je i za regulaciju aktivnosti AQP4 u moždanim stanicama kao i za relokalizaciju akvaporina unutar biljne stanice. Oslobađanjem glukagona i njegovog sekundarnog glasnika cAMP-a AQP8 pojačano se akumulira u staničnoj membrani. Kod biljaka pod utjecajem hormona ABA u uvjetima suše inicirana je interakcija akvaporina s proteinom TSPO što ga usmjerava u vakuolu gdje biva degradiran.



Slika 7. Hormonski regulirana translokacija akvaporina iz stanice u staničnu membranu  
( preuzeto i prilagođeno iz ref. 16)

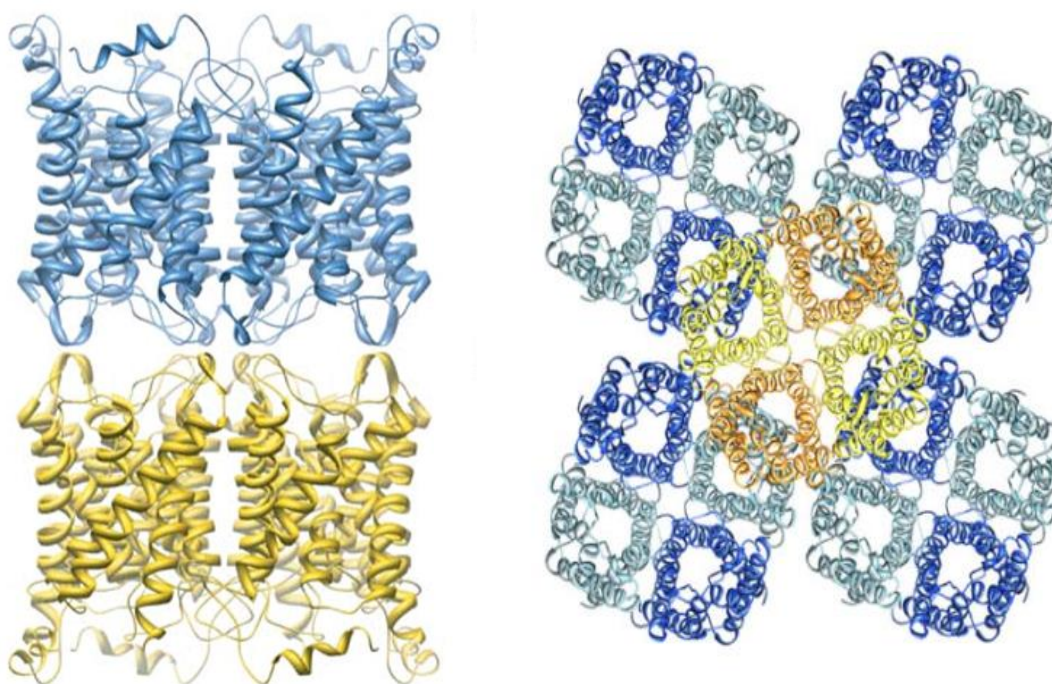
### 2.3.3. *Posttranslacijske modifikacije*

Značajan broj izoformi akvaporina posljedica je posttranslacijskih modifikacija u koje se ubrajaju fosforilacija, metilacija, ubikvitinacija, aciliranje i deamidizacija. Fosforilacija ima važnu, već opisanu, ulogu u homeostazi vode. Na važnosti dobiva jer ne uključuje utrošak energije za degradaciju i sintezu novih proteina. Metilacija svoju ulogu nalazi u unutarstaničnom kretanju proteina, a ubikvitinacija u razgradnji. Kod biljnih akvaporina aminokiseline Lys i Glu na N-kraju polipeptida podliježu mono- ili dimetilaciji pod sredstvom metiltransferaza koje je potrebno detaljnije istražiti. Uloga deamidizacije zasad nije poznata. <sup>22</sup>

### 2.3.4. *Organizacija akvaporina*

Akvaporini su, kao što je već rečeno, organizirani kao homotetrameri. Iako nije dokazano, moguće je da se monomeri akvaporina iz iste skupine, na temelju svoje strukturne sličnosti, udruže u dimere koje stabilizira disulfidna veza. Petlja D proteina pridonosi toj vezi. Dimeri se dalje mogu organizirati kao heterotetrameri pridonoseći tako različitosti u kombinacijama tetramera i njihovih funkcija. <sup>22</sup>

Kod APQ0, eksprimiranog samo u lećama oka, uočava se spajanje tetramera u strukture nalik rozetama čija je uloga zaustavljanje protoka vode. (Slika 8.) U tetrameru neglikoliziranog APQ0 prisutni su mostovi između N- i C-krajeva kao posljedica pogodnih elektrostatskih interakcija među aminokiselinama na C-krajevima. Proteolitičkim cijepanjem kimotripsinom izostaju ove interakcije i inicirano je formiranje nove strukture interakcijom između akvaporina susjednih stanica. Ravne izvanstanične površine tetramera stupaju u kontakt i formiraju strukturu zatvorene konformacije. Struktura je stabilizirana interakcijama petlji A i C. Prolaz vode najviše ometa konformacija Met176. Kod AQP4 eksprimiranog u živčanom sustavu također se uočava interakcija između tetramera AQP4 susjednih stanica preko Pro139 i Val142 na izvanstaničnoj petlji C. Kod takvih struktura akvaporini susjednih stanica ne leže točno jedan iznad drugoga, nego je tetramer iz jedne membrane u središtu četiriju tetramera iz druge membrane. Interakcije su slabije u usporedbi s onima u strukturi koju formira AQP0. Ovakve strukture pronalaze se u glija stanicama, a njihova uloga još nije poznata. Pretpostavlja se da sudjeluju u regulaciji adhezije stanica. <sup>4,7,17</sup>



Slika 8. Interakcija tetramera akvaporina AQP0(lijevo) i AQP4 (desno) susjednih stanica; žuti akvaporin je iz jedne, a plavi su iz druge stanice (preuzeto iz ref.4)

#### 2.4. Akvaporini kod čovjeka

Kod čovjeka je pronađeno 13 vrsta akvaporina. Sudjeluju u procesima kao što su probava, regulacija tjelesne temperature, neurohomeostaza, razmnožavanje, hidratacija kože, a imaju svoju ulogu i u osjetilima njuha, sluha i vida.<sup>12</sup> O važnosti akvaporina svjedoči i činjenica da su prisutni još tijekom razvoja fetusa. Akvaporini AQP 1, 3, 8 i 9 nalaze se u plodnoj opni i uključeni su u homeostazi plodne vode tijekom trudnoće.<sup>13</sup> Hormonski regulirani akvaporini AQP2 u bubrezima odgovorni su za održavanje koncentracije i volumena krvi. Nadalje, sudjelujući u regulaciji staničnog volumena akvaporini svoju ulogu pronalaze i u signalizaciji u živčanom sustavu. Dominantno su prisutni u središnjem živčanom sustavu. AQP4 ekprimiran je u glija stanicama, dok je AQP1 zastupljen u krvno-moždanoj barijeri. AQP3 u koži sudjeluje u prijenosu glicerola i vode, glavnih spojeva odgovornih za hidrataciju kože. Kod psorijaze je primijećeno da su AQP3 više ekprimirani u citoplazmi, a ne u staničnoj membrani, što otežava prijenos glicerola i vode u stanicu. Ekspresija AQP3 povezana je sa starenjem i izloženosti suncu. U oba slučaja njihova razina je smanjena i dovodi do suhoće kože. AQP3 prisutan je T-stanicama i makrofagima i time sudjeluje u imunološkoj obrani

organizma. AQP5 sudjeluje u izlučivanju slina pogodne koncentracije i viskoznosti. AQP1 prisutan je u kapilarnoj mreži srca, plućima i gornjim dišnim putevima gdje pridonosi kako hidrataciji i obrani dišnih puteva, tako i reapsorpciji viška alveolarne tekućine. Sudjeluju u procesu folikulogeneze i prilagodbi spermija na hipotonični ženski reproduktivni trakt. Ustanovljeno je da i kontrakcije mišića uključuju rapidni protok vode pa se tako AQP1 i AQP4 mogu pronaći u skeletnim mišićima. Probava bez sudjelovanja akvaporina bila bi nezamisliva.<sup>20</sup> Iako je primarna funkcija akvaporina protok vode, ovi proteini pojavljuju se i u stanicama koje nemaju ulogu u transportu fluida, adipocitima i hepatocitima.

## 2.5. Akvaporini kod biljaka

Akvaporini igraju veliku ulogu u fiziologiji biljaka. Sudjeluju u osmotskoj regulaciji, signaliziranju i detoksikaciji stanice od ROS-a i izmjeni plinova. Unutar stanice nalaze se u plazma membrani, vakuoli, plastidima i endoplazmatskom retikulumu. Ovisno o lokaciji i funkciji kod viših biljaka razlikuju se PIP (*plasma membrane intrinsic proteins*), TIP (*tonoplast intrinsic proteins*), NIP (*nodulin26-like intrinsic proteins*), SIP (*small basic intrinsic proteins*) i XIP (*uncategorized intrinsic proteins*) akvaporini.<sup>22</sup> Na razini tkiva, značajan broj istraživanja pokazao je da su određeni akvaporini, suprotno uvriježenom mišljenju da se svi dominantno nalaze u stanicama korijena biljke, eksprimirani više u listovima. Zanimljivo je da je ekspresija akvaporina ovisna o stadiju razvoja listova. Neki su eksprimirani više u mladim listovima, dok su drugi prisutniji u razvijenim listovima. Listovima je za rast potreban neprekinut dotok vode. U skladu s time uočeno je da se više akvaporina nalazi u epidermalnim stanicama elongacijskih zona lista u usporedbi sa zonama koji nisu u fazi rasta.

Nedostatak vode, koji osjeća korijen biljke, utječe na ekspresiju akvaporina u listovima. U takvim uvjetima dolazi do povećane ekspresije pojedinih akvaporina koji pomažu u njenom oporavku. U uvjetima stresa uzrokovanih salinitetom i deficitom nutrijenata dolazi do povećanja stope ekspresije gena pojedinih akvaporina u elongacijskim zonama, kao posljedica postranslacijskih modifikacija kao što je fosforilacija, i osigurava rast listova.<sup>10</sup> No, njihova prekomjerna ekspresija nije uvijek od koristi i može dovesti do ranijeg uvenuća biljke, npr. kod duhana. Istovremeno ekspresija akvaporina u korijenu je smanjena kako bi se spriječilo otjecanje vode niz koncentracijski gradijent. Temperaturnom stresu zimi biljke se opiru dormancijom koja podrazumijeva utišavanje metaboličkih procesa, rasta i

razvoja, tijekom koje se uočava smanjenje ekspresije akvaporina. Akumulacija akvaporina također ovisi i o svjetlosti, no taj mehanizam je nedovoljno istražen. Smanjenje broja akvaporina iz skupine PIP2 kod viših biljaka u neosvijetljenom okolišu odgovara smanjenoj potrebi za izmjenom plinova potrebnih za fotosintezu koja se ne odvija bez prisutnosti Sunčeve svjetlosti. Kao nusprodukt fotosinteze mogu nastati reaktivne oksidativne vrste ROS od kojih je vodikov peroksid jedan od opasnijih zbog dugog vremena zadržavanja. Putem akvaporina iz XIP skupine vodikov peroksid eliminiran je iz kloroplasta i usmjeren u vakuolu.

10,16

Za rast i razvoj otpornosti na biotički i abiotički stres biljkama su potrebni mikronutrijenti kao što su bor i silicij za koje se pokazalo da ulaze u stanicu putem akvaporina iz NIP skupine. Uz nutrijente, omogućen je i transport selenija, arsena u obliku arsenitne kiseline i antimona koji mogu biti toksični za biljku. Kontrolirana (de)hidracija potrebna je u procesima kao što su oprašivanje, sazrijevanje i klijanje sjemena. Uloga akvaporina dolazi do izražaja i pri cvatnji i otvaranju i zatvaranju latica ovisno o temperaturi zraka. Nadalje, sudjeluju u izmjeni vode preko stanične membrane kod pulvina inicirajući reverzibilnu promjenu njegovih volumena kako bi došlo do pomicanja listova. Kod biljke *Dionaea muscipula* susreće se zatvaranje „zamke“ za kukce čija brzina opada inhibicijom akvaporina.

10,22

## 2.6. Uloga akvaporina u razvoju potencijalnih terapeutika

Broj izoformi akvaporina odgovara brojnim fiziološkim procesima u kojima je transport vode ključan korak. Iz tog razloga pozornost u razvoju potencijalnih terapeutika usmjerila se prema ovim proteinima. Regulacijom transporta vode u ciljnim stanicama mogla bi se kontrolirati klinička slika pacijenta.

Uočena je povezanost ekspresije i funkcije akvaporina s određenim bolestima. Kod kroničnih stanja koja uključuju zadržavanje vode (zatajenje srca i ciroza jetre) pojačana je ekspresija AQP2, stoga bi inhibicija ovih akvaporina reducirala zadržavanje vode. AQP4 sudjeluje u akumulaciji vode u mozgu kod citotoksičnog edema, dok je istovremeno kod vasogenog edema odgovoran za nakupljanje vode u izvanstaničnom prostoru kao posljedica narušene krvno-moždane barijere. Kod tumorskih stanica kod kojih je uočena ekspresija akvaporina uvijek su zastupljeni akvaporini AQP1, dok prisutnost ostalih akvaporina varira. Tumori s akvaporinima pokazali su se invazivnijim od onih bez jer AQP1 unosom vode

pospješuju migraciju stanica, a posljedično i širenje tumorskih stanica krvožilnim sustavom. AQP3 unosom glicerola za generaciju ATP-a potpomaže zacjeljenje rana, dok njegova inhibicija može spriječiti ili pomoći u terapiji tumora kože. AQP3 prisutni su u T-stanicama i makrofagima, stoga bi njihova inhibicija pokazala protuupalne efekte. Pacijenti bez eksprimiranih AQP7 pokazuju znakove pretilosti i rezistentnosti na inzulin. Njegova aktivacija ili povećavanje ekspresije u adipocitima pridonijela bi u regulaciji pretilosti.

Razvoj terapeutika koji bi regulirali aktivnost akvaporina je izazovan. Pojedini akvaporini eksprimirani su u različitim tkivima sudjelujući u širokom spektru fizioloških procesa, stoga odabrani modulator mora zadovoljiti uvjet selektivnosti. Mutacija ulaza akvaporina s citoplazmatske i izvanstanične strane nema utjecaja na propusnost vode. Modulatori koji reguliraju aktivnost vežu se uglavnom za mjesto u suženju kanala akvaporina, međutim vezanje same molekule ne povlači da je nužno zaustavljen protok vode. Interakcije se ostvaruju pretežno vodikovim vezama budući da akvaporini propuštaju male neutralne molekule i nema interakcija između naboja. Modulatori se dijele u četiri skupine: Cys-reaktivni inhibitori u čiji sastav ulazi teški metal, male molekule koje inhibiraju protok vode, male molekule koje ciljaju na intetrakciju AQP4 i NMO autoantitijela te kemijski šaperoni. Živin(II) klorid, koji spada u prvu skupinu modulatora, veže se kovalentno za Cys189 u AQP1 i sterički ometa prolazak vode. Uz živu, teški metali koji se još pojavljuju u inhibitorima su srebro i zlato. Primjer male molekule inhibitora je neselektivni tetraetilamonijev kation ( $\text{TEA}^+$ ), reverzibilni inhibitor akvaporina AQP1.

Rijetka autoimuna bolest optički neuromijelitis (NMO) uzrokovana je vezanjem specifičnih antitijela AQP4-IgG na izvanstaničnu površinu AQP4 prisutnog u središnjem živčanom sustavu što vodi do upalnog procesa, a na kraju do destrukcije tkiva. Pacijent pokazuje znakove paralize i ostaje bez vida. Razvijeni su kompetitivni inhibitori koji se natječu za vezno mjesto s antitijelom AQP4-IgG, a vezani za površinu akvaporina ne utječu na njegovu ekspresiju u membrani stanice niti propusnost vode. Jedan takav inhibitor je tamariksetin. Neselektivni šaperoni, kao što su glicerol i TMAO ( trimetilamin N-oksid) pokazali su se kao dobri inhibitori u pogrešnom sklapanju AQP2 koje uzrokuje rijetki poremećaj nefrogenski dijabetes insipidus(NDI). Pomaganjem šaperona u pravilnom sklapanju proteina AQP2 regeneriran je njegov transport s endoplazmatskog retikuluma u membranu, a posljedično je i uspostavljen protok vode koji je nužan za održavanje normalne koncentracije urina.



Povećavanje propusnosti vode pokušava se postići transferom gena za AQP pri čemu treba paziti da gen završi u ciljanom tipu stanica ne izazivajući imunosnu reakciju. Također, pokušavaju se razviti lijekovi koji bi utišali ekspresiju akvaporina kod parazita čime bi se smanjila njihova virulentnost, ali bi postali rezistentni na postojeću antiparazitsku terapiju budući da su akvaporini mjesto ulaska lijekova u stanice parazita. <sup>21</sup>

### § 3. LITERATURNI IZVORI

1. D.L. Nelson, M.M.Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 6th Edition, W.H. Freeman, New York, 2013, str.418-420.
2. W. Stillwell, *An introduction to Biological Membranes*, 2nd Edition, Elsevier, 2016, str. 423-451.
3. A. S. Verkman, A. K. Mitra, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **278** (2000) F13- F28
4. T. Gonen, T.Walz, *The structure of aquaporins*, *Q. Rev. Biophys.* **39** (2006) 361-396.
5. K. Murata, K. Mitsuoka, T. Hirai, T. Walz, P.Ager, J. B. Heymann, A. Engel, Y. Fujiyoshi, *Nature* , Vol. 407, 2000, str.599-605.
6. J. S. Hub, B.L.de Groot, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Vol. 105, 2007, str. 1198-1203.
7. M. Ozu, L. Galizia, C. Acuna, G.Amodeo, *Aquaporins: More than functional monomers in a tetrameric Arrangement*, *Cells* 2018, 7, 209  
<https://www.mdpi.com/2073-4409/7/11/209#cite> (datum pristupa 15.rujna 2020.)
8. H. Sui, B. Han, J.K. Lee, P. Walian, B. K. Jap, *Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel*, *Nature*, Vol. 414 , 2001, str. 872-878.
9. E. Tajkhorshid, P. Nollert, M. Jensen, L. Miercke, J. O'Connell, R. M. Stroud, K. Schulten, *Science*, Vol. 296, 2002, str.525-530.
10. R. B. Heinen, Q. Ye, F. Chaumont, *Role of aquaporins in leaf physiology*, *J. Exp. Bot.*, Vol. 60, 2009, str.2971-2985.
11. J. Zwiazek, H. Xu, X. Tan, A. Navarro- Rodenas, A.Morte, *Signifacance of oxygen transport through aquaporins*, *Sci.Rep.* 2017; 7; 40411
12. D. Brown, *The discovery of water channells(aquaporins)*, *Ann. Nutr. Met.*,2017, str.37-42.
13. C. Prat, L. Blanchon, V. Borel, D. Gallot, A. Herbet, D. Bouvier, G. Marceau, V. Sapin, *Ontogeny of aquaporins in human fetal membranes*, *Biol. Reprod.*, Vol.86, Issue 2, 2012, 48, str. 1-8.
14. A. Ablimit, T. Aoki, T. Matsuzaki, T. Suzuki, H. Hagiwara, A. Takami, K. Takata, *Imunolocalization of water channel aquaporins in the veronasal organ of the rat: expression of AQP4 in neuronal sensory cells*, *Chem. Senses* 33, 2008, str. 481-488.

15. S. T. Horserfield, Y. Wang, K. Hedfalk, U. Johanson, M. Karlsson, E. Tajkhorshid, R. Neutze, P. Kjellbom, *Structural mechanism of plant aquaporin gating*, *Nature*, Vol. 439, 2006, str.688.-694.
16. <https://open.oregonstate.education/aandp/chapter/26-2-water-balance/>(pristup 12.travnja 2020.)
17. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2396442/> (pristup 13.travnja 2020.)
18. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3396453/> (pristup 13.travnja 2020.)
19. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1635436/> (pristup 1.svibnja 2020.)
20. R. Day, P. Kitchen, D. S. Owen, C. Bland, L.Marshall, A.C. Conner, R. M. Bill, M. T. Conner, *Human aquaporins: Regulators of transcellular water flow*, *Biochim. Biophys. Acta* 1840, Elsevier, 2014, str. 1942-1956.
21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4067137/> (pristup: 4.svibnja 2020.)
22. C.Maurel, Y.Boursiac, D.Luu, V.Santoni, Z.Shahzad, L.Verdoucq, *Aquaporins in plants*, *Physiol. Rev.*, Vol.95, 2015, str. 1321-1358.