

Maja Potokar¹

Vodni kanalček akvaporin 4 – vloga v osrednjem živčnem sistemu

Aquaporin 4 – Its Role in the Central Nervous System

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: vodni kanalčki, akvaporini, astrociti, glija, možganski edem, nevromielitis optika

Akvaporini ali vodni kanalčki so transmembranske beljakovine, skozi katere pospešeno prehajajo predvsem molekule vode. Najprej so bile odkrite v sesalskih celicah, kasneje pa tudi pri različnih vrstah drugih organizmov, od mikrobov do drugih vretenčarjev in rastlin. Njihova vloga pri delovanju celic in tkiv je zelo verjetno raznolika, prvotni predmet raziskav pa je njihova vloga pri vzdrževanju homeostaze vode. Akvaporini so pretežno prepustni za vodo, nekateri med njimi pa prepuščajo tudi majhne molekule, kot sta glicerol in sečnina. Različne vrste tkiv izražajo različne vrste akvaporinov in njihovih izooblik. V bolezenskih razmerah se v tkivih spreminjata njihovo izražanje in porazdelitev po celici. V osrednjem živčnem sistemu je akvaporin 4 najpogostejši vodni kanalček, ki se nahaja na endolimfatskih celicah in astrocitih. Največ akvaporina 4 je na astrocitih, ki so najštevilčnejša vrsta celic glije v osrednjem živčnem sistemu. Astrociti so anatomsko umeščeni tako, da so v stiku z mikrovaskulaturo, žilnico (lat. *pia mater*) in nevroni. Izražanje akvaporina 4 je predvsem obsežno na izrastkih astrocitov, ki so v stiku z mikrovaskulaturo in žilnico. V tem preglednem članku je predstavljena zgradba akvaporina 4, njegova vloga pri vzdrževanju homeostaze vode in pri patologiji nevrološke bolezni nevromielitis optika.

ABSTRACT

KEY WORDS: aquaporin, astrocyte, glia, brain edema, neuromyelitis optica

Aquaporins or water channels are transmembrane proteins that enable enhanced transport of water molecules. They were first identified in mammalian cells and later discovered in various organisms, such as microbes, other vertebrates and plants. Aquaporins have diverse roles in the functioning of cells and tissues, however, primarily they are being studied for their role in the regulation of water homeostasis. Aquaporins primarily transport water, while some of them also transport other small molecules, such as glycerol and urea. Different tissues express different types of aquaporins and their isoforms. Their expression and cellular distribution may be altered in pathological conditions. Aquaporin 4 is the most abundant aquaporin in the central nervous system, expressed in ependymal cells and astrocytes. Of the two cell types, aquaporin 4 is predominantly

¹ Dr. Maja Potokar, univ. dipl. biol., Laboratorij za nevroendokrinologijo – molekularna celična fiziologija, Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; Celica Biomedical, Tehnološki park 24, 1000 Ljubljana; maja.potokar@mf.uni-lj.si

expressed in astrocytes, which are the most abundant glia cells in the central nervous system. The anatomical position of these cells enables them contact with microvasculature, pia and neurons. This review describes the structure of aquaporin 4, its role in the regulation of water homeostasis and the pathology of the neurologic disorder neuromyelitis optica.

UVOD

Voda je ena izmed osnovnih sestavin celic in zunajceličnih prostorov. Skozi plazemske membrane celic lahko prehaja na dva načina, in sicer s prosto difuzijo ter skozi vodne kanalčke akvaporine, ki omogočajo za nekaj velikostnih razredov hitrejšo prevajanje vode v smeri osmotskega gradienta (1–3). Akvaporini so transmembranske beljakovine, ki so bile odkrite v devetdesetih letih prejšnjega stoletja, in sicer je bil prvi med njimi akvaporin 1 v človeških eritrocitih (1). Kasneje so bili akvaporini najdeni v tkivih številnih sesalcev in pri nevretenčarjih, rastlinah ter mikroorganizmih (4). Nekateri akvaporini prevajajo izključno vodo, drugi pa poleg vode tudi majhne molekule, kot sta npr. glicerol in sečnina (5). Danes poznamo 13 tipov akvaporinov. V osrednjem živčnem sistemu (OŽS) je tako v možganih kot hrbtenjači najpogostejši akvaporin 4 (angl. *aquaporin 4*, AQP4) (2, 3, 6, 7). Izraža se predvsem na membranah astrocitov, najštevilčnejših celicah glije OŽS. V možganih je izražanje na astrocitih omejeno pretežno na astrocitne izrastke na stikih med možganovino in krvjo ter možganovino in možgansko-hrbtenjačno tekočino (angl. *cerebrospinal fluid*, CSF) (2, 8–10). V hrbtenjači in optičnem živcu je AQP4 pretežno na perivaskularnih izrastkih astrocitov in astrocitnih izrastkih, ki tvorijo t. i. nevroglijsko pregrado na meji z možganskimi ovojnicami (7, 11).

Vloga AQP4 v OŽS je zelo raznolika. Vpleten je v uravnavanje znotraj- in zunajcelične prostornine, vzdrževanje homeostaze kalijevih ionov, kroženje CSF, resorpcijo medceličnine in odstranjevanje odpadnih produktov presnove, udeležen pa je tudi pri

vnetnih procesih, zaznavanju osmotskih sprememb, migraciji celic in signaliziranju s kalcijevimi ioni (2, 5). AQP4 se ne izraža le v OŽS, ampak tudi v drugih tkivih (3).

V preglednem članku je predstavljena zgradba AQP4, njegova vloga pri vzdrževanju homeostaze vode v OŽS in njegova vpletenost v patologijo avtoimunske bolezni nevromielitis optika (NMO).

AKVAPORIN 4 – ZGRADBA IN IZOBLIKE

AQP4 je hidrofobna beljakovina, ki jo sestavlja šest nepolarnih transmembranskih domen, med seboj povezanih s petimi zankami A–E (slika 1). Zanka B in E sta, tako kot pri vseh vrstah akvaporinov, pomembni za tvorbo kanalčka, skozi katerega prehajajo molekule vode v odvisnosti od osmotskega gradienta (12–14).

V astrocitih so identificirali več izooblik AQP4, ki jih kodira gen *AQP4*. V človeških astrocitih so danes znane tri izooblike, v podganjih pa šest, vse pa so alternativni prepisi istega gena (3, 15). Prvi dve izoobliki, ki sta bili opisani pri človeku, podgani in miši, sta AQP4a (M1) in AQP4c (M23), alternativna prepisa z dveh različnih metioninskih mest (16–19). Podrobna analiza podganjega gena *AQP4* je razkrila štiri nove izooblike: AQP4b, AQP4d, AQP4e (imenovana tudi izooblika Mz) in AQP4f (15, 20). Izooblika AQP4Mz, ki po velikosti ustreza AQP4e (36 kDa), je bila kasneje opisana tudi pri miši, prašiču in človeku (21).

Izooblike AQP4, ki potrjeno prepuščajo vodo, so AQP4a, AQP4c in AQP4e (15). Izooblike AQP4b, AQP4d in AQP4f so alternativne spojivene različice izooblik AQP4a,

AQP4c, AQP4e in glede na svojo strukturo (manjka jim ekson 2) morda ne prevajajo vode (3, 15, 22). Zaradi odsotnosti eksona 2 imajo namreč le štiri transmembranske domene, v primerjavi z ostalimi izooblikami, ki jih imajo šest. Imajo pa ohranjeno zaporedje aminokislin asparagin-prolin-alanin (motiv NPA), ki tvori poro za prehod molekul vode skozi membrano (15). Za določitev vloge znotrajceličnih izooblik AQP4 in za preverjanje, ali res ne prevajajo vode, so potrebne nadaljnje raziskave.

Različne izooblike AQP4 imajo tudi različno celično porazdelitev. AQP4a in AQP4c sta pretežno razporejeni na plazemski membrani izrastkov perivaskularnih astrocitov. V kulturah astrocitov sta potrjeni tudi znotrajcelično (19, 23, 24). AQP4e se podobno nahaja znotrajcelično v astrociti in na njihovi plazemski membrani. Obseg porazdelitve AQP4e na plazemski membrani je dinamičen in odvisen tudi od osmolarnosti zunajceličnega medija (20, 25). Tovrstna dinamika še ni bila potrjena pri izooblikah AQP4a in AQP4c. Znotrajcelično se v astrociti AQP4e nahaja na Golgijevem aparatu, poznih endosomih in na zelo dinamičnih, z membrano obdanih mešičkih, s katerimi se premikajo po citoplazmi (25). Ti mešički omogočajo dostavo AQP4e na plazmalemo in njihov umik s plazmaleme v procesu endocitoze (22). Izooblike AQP4b, AQP4d in AQP4f so v astrociti znotrajcelične (15, 22). Njihova znotrajcelična porazdelitev še ni natančno raziskana. V primarnih kulturah astrocitov je bila do zdaj potrjena prisotnost AQP4d na Golgijevem aparatu in poznih endosomih, natančna lokalizacija treh izključno znotrajceličnih izooblik ter njihova vloga pa sta predmet trenutnih raziskav (22).

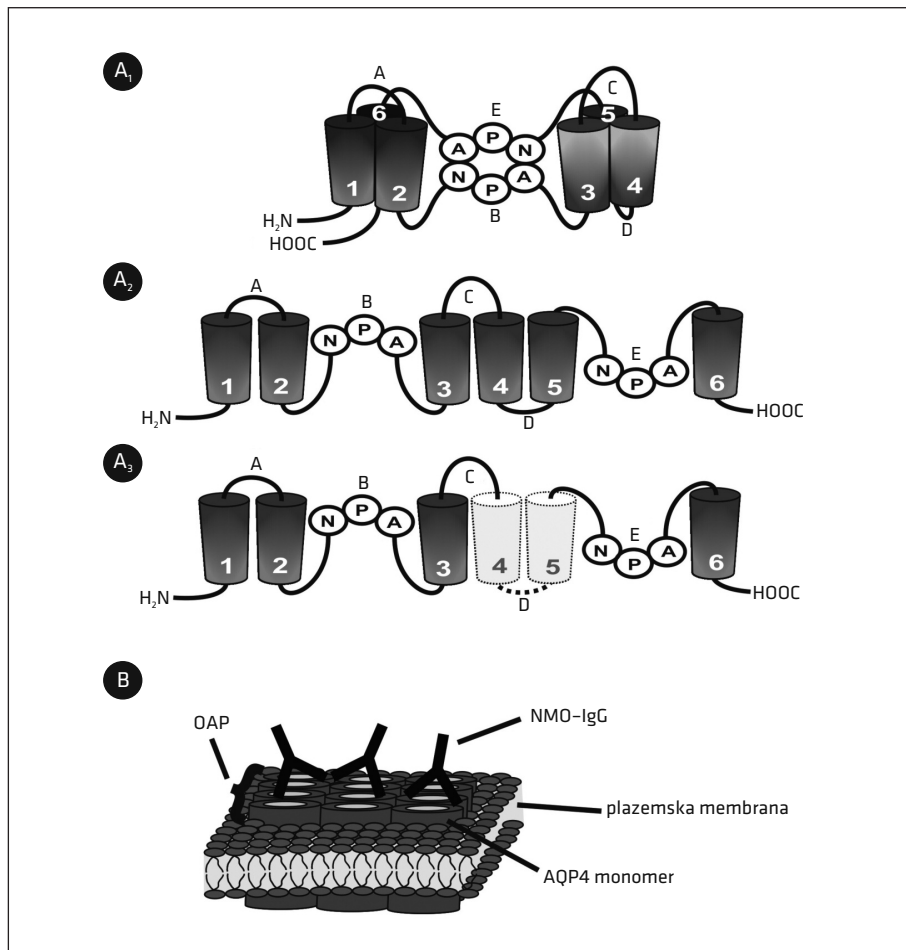
Kot zanimivost je pri AQP4 opisana še ena izooblika, in sicer AQP4-Δ4, ki je tudi alternativni prepis gena AQP, opisana pa je bila v človeški skeletni mišičnini (26). Tej izoobliki manjka prepis eksona 4, posledično pa del transmembranske domene 5

in zanka E, ki je eden izmed motivov NPA, potrebnih za tvorbo strukture pore za prehod vodnih molekul (slika 1). Motiva NPA (zanki B in E) povezujeta transmembranske domene 2 in 3 ter 5 in 6 (26–28). Ko so AQP4-Δ4 izrazili v celicah celične linije HeLa, voda skozi plazmalemo ni prehajala in AQP4-Δ4 je bil lokaliziran pretežno na endoplazemskem retikulumu, v manjši meri pa tudi na plazmalemi. Vloge te izooblike ne poznamo natančno, ena izmed hipotez predvideva, da naj bi prek dominantno negativnega učinka zaradi heterodimerizacije med AQP4 in AQP4-Δ4 uravnavala izražanje in aktivnost izooblik AQP4 na plazmalemi (26).

Za izooblike AQP4, ki so na plazemski membrani (AQP4a, AQP4c, AQP4e), je značilno, da se monomeri združujejo v večje strukture. Take strukture so bile opisane v astrocitnih vzorcih, pridobljenih s tehniko zamrzovalnega lomljenja in posnetih z elektronsko mikroskopijo (29). Nadaljnje raziskave teh struktur so razkrile, da se posamezni monomeri AQP4 najprej združujejo v tetramere, ti pa nadalje v ortogonalne skupke delcev (angl. *orthogonal array of particles*, OAP), ki so dobili ime po značilni obliki, vidni z elektronskim mikroskopom (slika 1) (2). OAP so prisotni tako na astrociti kot tudi na drugih celicah, ki izražajo AQP4 (npr. traheje, sarkolema, parietalne celice želodca, principalne celice ledvic, ciliarno telo in črevesje) (30). V OŽS so OAP prisotni na plazmalemi izrastkov perivaskularnih astrocitov in izrastkov astrocitov, ki tvorijo nevroglijsko pregrado pod žilnico (24, 31, 32). OAP se razlikujejo po velikosti in obliki. Njihovi osnovni gradniki, ki so tetrameri AQP4, merijo 4–6 nm, OAP pa tvori do nekaj deset tetramerov (31). V izrastkih astrocitov je lahko tudi do 500 ali 600 OAP na μm^2 (33). Poskusi na izoliranih celicah kažejo, da so OAP lahko sestavljeni iz različnih izooblik AQP4 (AQP4a, AQP4c in AQP4e). Med njimi ima samo AQP4c intrinzično lastnost povezovanja v OAP prek

specifičnega zaporedja na N-terminalnih delih, AQP4a in AQP4e pa se lahko povezuje v OAP le prek vezave na AQP4c (20, 31, 34). Kako so sestavljeni OAP v tkivu, je še v veliki meri neraziskano, možno je, da so tudi v tkivih sestavljeni iz več izooblik AQP4 (31, 32, 35–37).

Prav tako je slabo raziskana natančna vloga OAP v plazmalemii astrocitov. Postavljenih je nekaj hipotez, vključno s to, da naj bi OAP pospeševali prehajanje vode skozi plazmalemo, odstranjevali makromolekule iz medceličnine možganov in izboljšali izmenjavo plinov med krvjo in možgani.



Slika 1. Strukture različnih izooblik akvaporina 4. Teoretični model peščene ure. Akvaporin 4 ima šest transmembranskih domen (1–6) in pet zank (A–E), ki povezujejo domene, zanki B in E imata obe evolucijsko ohranjeni ohranjeni zaporedje aminokislin asparagin-prolin-alanin (motiv NPA) srečata se na sredini lipidnega dvosloja in tvorita ozek kanalček za prehod molekul vode (A₁). Izooblike akvaporina 4 AQP4a, AQP4c in AQP4e imajo šest transmembranskih domen (1–6) in pet zank (A–E) (A₂). Izooblike akvaporina 4 AQP4b, AQP4d, AQP4f, ki so alternativne spojitelne variante, nimajo transmembranskih domen 4 in 5 ter zanke D, ki ju povezuje (na sliki označeno s svetlejšim odtenkom in črtkano črto) (A₃). Shema plazemske membrane, v katero so umeščeni monomeri akvaporina 4, ki se združujejo v ortogonalne skupke delcev. Nevromielitis optika imunoglobulini 4 se vežejo na akvaporin 4 v ortogonalne skupke delcev (B). OAP – ortogonalni skupki delcev (angl. *orthogonal array of particles*), NMO-IgG – nevromielitis optika imunoglobulin G, AQP4 – akvaporin 4 (angl. *aquaporin* 4).

Nobena od teh hipotez še ni nedvomno potrjena (38–40).

Kaže, da je nadzor prehajanja vode skozi AQP4 v astrocitih precej kompleksen in verjetno poteka na več ravneh: npr. na ravni fosforilacije kanalčka, na ravni izražanja in uravnavanja gostote kanalčkov v plazmalemi (prerazporejanje po plazmalemi in dostava kanalčkov z mešički na plazmalemo) in na ravni združevanja kanalčkov v OAP (2, 22, 41–44). Uravnavanje prehajanja vode skozi akvaporine na astrocitih predvsem v bolezenskih razmerah pomembno prispeva k uravnavanju homeostaze vode v OŽS.

VLOGA AKVAPORINA 4 PRI HOMEOSTAZI VODE V OSREDNJEM ŽIVČNEM SISTEMU

V OŽS se voda nahaja v različnih predelkih, kot so kri, znotrajcelična tekočina, medceličnina, ki obdaja celice možganovine in hrbtenjače, ter CSF, ki zapolnjuje večje prostore v OŽS in okoli njega (45). Sestava in prostornina CSF ter medceličnine sta pomembna za učinkovito delovanje možganskih celic, uravnavana pa sta s pregradami, ki preprečujejo prost pretok molekul med OŽS in krvjo, ter mehanizmi, ki omogočajo tvorbo tekočin v OŽS in vodo prerazporejajo in odstranjujejo (46). Med predelki v možganovini voda prehaja na osnovi osmotskih gradientov in hidrostatskih sil. Molekule vode sicer lahko prehajajo celične membrane neposredno in morda tudi v majhni meri skozi nekatere glukozne transporterje, številne raziskave pa kažejo, da ima glavno vlogo pri prehajanju vode skozi membrano AQP4 (45, 47). Voda, ki v možganovino vstopa, mora tudi uravnavano izstopati. Tvorba CSF poteka prek horoidnega pleteža, tvorba medceličnine pa iz možganske mikrovaskulature. To nastajanje je natančno uravnavano z izhodom tekočine v kri in v subarahnoidni prostor (48). Prepoznavanje izhodnih poti za vodo je izrednega kliničnega pomena. Porušeno ravnotežje med

tvorbo in izhajanjem vode lahko povzroči dvig znotrajlobanjskega tlaka do te mere, da škodljivo vpliva na delovanje možganov (10).

Pomembno vlogo AQP4 pri vzdrževanju homeostaze vode v možganih nakazuje njegova razporeditev v tkivu na plazemskih membranah astrocitov na stikih med krvožiljem in možgani ter med možgani in CSF (2). AQP4 se nahaja na astrocitnih izrastkih ob žilnici, ki sestavljajo t. i. glialno pregrado na meji med OŽS in CSF, na perivaskularnih izrastkih astrocitov, ki so na stiku med OŽS in krvožiljem, in na bazolateralni membrani iz ependimskih celic in subependimskih izrastkov astrocitov, ki razmejuje OŽS in CSF (9, 24). Takšen vzorec razporeditve AQP4 na mejah med možgani in glavnimi predelki, ki vsebujejo vodo, že sam nakazuje, da je AQP4 vpleten v pospešeno prehajanje vode med možganovino in njeno okolico ter tako uravnava bazalno količino vode v možganovini (10, 45, 46). Da so AQP4 na izrastkih astrocitov pomembni za uravnavanje prehajanja vode preko krvno-možganske pregrade (KMP), so potrdile tudi raziskave na genetsko spremenjenih miših, saj so v tistih, ki na astrocitih niso izražale AQP4, izmerili manjši privzem vode v možgane (49). Takšne raziskave tudi kažejo, da je AQP4 udeležen tudi pri pospešenem izhajanju odvečne vode iz možganovine. Pri tem naj bi bil udeležen predvsem AQP4, ki se nahajajo na astrocitih ob membranski ovojnici žilnici, a je to treba še potrditi (10).

V več raziskavah so izmerili neposredni vpliv AQP4 na prehodnost plazemske membrane astrocitov za vodo. Ugotovili so, da popolna odsotnost AQP4 do sedemkrat zmanjša prehajanje vode skozi plazmalemo izoliranih astrocitov in za desetkrat zmanjša prehajanje vode preko KMP v možganih miši (50, 51). V možganih podgane je tudi že samo za tretjino utišano izražanje AQP4 izjemno učinkovito zmanjšalo prehodnost plazmaleme astrocitov za vodo (52). Vloga

AQP4 pri vzdrževanju homeostaze vode je morda manjša v normalnih fizioloških razmerah pri dokaj počasnem prehajanju vode v možganski prostor in iz njega, ki lahko poteka tudi prek od AQP4 neodvisnih poti. Pri poškodbah in boleznih OŽS (poškodbe možganov, meningitis, možganski tumorji in hidrocefalus) pa dinamika odtekanja in prijetanja vode v možganski prostor naraste, kar povzroči porast znotrajlobanjskega tlaka zaradi nabiranja vode v znotrajlobanjskih predelkih. V takšnih razmerah AQP4 pospešuje prehajanje vode v možgane in iz njih ter ima tudi pomembno vlogo pri razvoju edema (45, 53).

AQP4 se je izkazal tudi kot zelo pomemben za hitro uravnavanje prostornine astrocitov pri bolezni. Celice ves čas uravnavajo prostornino, da kompenzirajo nihanja osmotskega tlaka, ki nastajajo zaradi stalnih sprememb v znotraj- in zunajcelični osmolarosti (54). Celice se na splošno na hiposmotske pogoje odzovejo s hitrim nabrekanjem, ki mu sledi prilagoditveni odgovor, t. i. uravnavano zmanjšanje prostornine (angl. *regulatory volume decrease*, RVD), med katerim se prostornina celice zmanjša na normalno celično prostornino (55). AQP4 v astrocitih je odgovoren za kinetiko hitrega nabrekanja, kar nato sproži RVD (56). Vse izooblike AQP4, ki se nahajajo na plazmalemi astrocitov, AQP4a, AQP4c in AQP4e, imajo vlogo pri RVD astrocitov, ki sledi nabrekanju astrocitov (56, 57). V mišjih astrocitih, v katerih so preverili prisotnost izooblik AQP4a in AQP4c, je bila časovna konstanta celičnega nabrekanja krajša in kinetika periode RVD hitrejša kot pri genetsko spremenjenih astrocitih brez AQP4 (56). Tudi izooblika AQP4e zviša dinamiko nabrekanja astrocitov in njihov RVD v hipoosmotskih razmerah, ki so model za pogoje edema, kar je bilo pokazano na podganjih astrocitih. Poleg tega astrociti, ki imajo zvišano izražanje izooblike AQP4e, tudi bolje kompenzirajo vračanje prostornine celic na osnovno ravnen (57).

IZRAŽANJE AKVAPORINA 4 MED BOLEZNIJO

V različnih bolezenskih razmerah lahko pride do sprememb v izražanju in celični razporeditvi AQP4 v astrocitih. Prisotnost AQP4 na plazmalemi se bodisi zviša ali zniža, kar je lahko povezano tudi s spremjenim izražanjem gena AQP4 (3).

Spremembe v izražanju AQP4 na plazmalemi astrocitov so bile na primer zabeležene pri bolnikih z Alzheimerjevo boleznijo. Izsledki raziskav na bolnikih z Alzheimerjevo boleznijo v nekaterih primerih pokažejo znižanja, v nekaterih primerih pa zvišanja količine AQP4 na plazmalemi astrocitov. Te razlike lahko izvirajo iz vzorčenja iz različnih področij možganov, morda pa tudi zaradi vzorčenja v različnih stopnjah razvoja bolezni (3). Zvišano izražanje AQP4 na plazmalemi astrocitov so na primer opazili v bližini krvnih žil na stikih s CSF in možganovino in je bilo bolj izraženo pri cerebralni amiloidni angiopatiji. Zvišano izražanje AQP4 je bilo večje okoli senilnih plakov, predvsem v začetku tvorbe usedlin amiloida β (58, 59). Ravno tako so zvišano izražanje AQP4 opazili tudi v astrocitih možganov bolnikov s Creutzfeldt-Jakobovo boleznijo (predvsem v možganski skorji in belini) ter v astrocitih bolnikov z multiplo sklerozo (predvsem v okolici plakov) (60, 61). Poleg nevrodegenerativnih bolezni so zvišano izražanje AQP4 v astrocitih pri človeku izmerili tudi pri drugih bolezenskih stanjih, npr. pri možganskih tumorjih z okoliškim edemom, po subarahnoidni krvavitvi in pri ishemiji (62–64). Večje izražanje AQP4 na plazmalemi astrocitov naj bi pospeševalo prehajanje vode skozi stene krvnih žil, nevroglijske pregrade na stiku z žilnico in prek ependimskih celic. Tako naj bi vplivalo na razvoj možganskega edema (65, 66).

Občutna znižanja količine AQP4 so opazili na plazmalemi perivaskularnih astrocitov v hipokampusu bolnikov z epilepsijo. Manjšo količino AQP4 na plazmalemi so pripisali neustreznemu umestitvi distrofin-

skega kompleksa, ki je pomemben za sidranje AQP4 v plazmalemo (66). Izrazito znižanje količine AQP4 na astrocitih je značilno tudi za bolezen NMO (67).

AKVAPORIN 4 IN NEVROMIEELITIS OPTIKA

AQP4 ima pomembno vlogo pri patološki nevrološki bolezni NMO. Gre za redko avtoimunsko bolezen, pri kateri propada mielin v OŽS. Bolezen prizadene predvsem vidni živec in hrbtenjačo (68, 69). Dolgo je prevladovalo mnenje, da je NMO oblika multiple skleroze, vendar je danes na osnovi kliničnih, laboratorijskih, imunoloških in bolezenskih značilnosti opisana kot samostojna bolezen (69). Pri več kot treh četrtinah bolnikov z NMO so prisotna specifična protitelesa proti AQP4 (70). Ta protitelesa so pri odkritju poimenovali nevromielitis optika imunoglobulin G (NMO-IgG). To so imunoglobulini (Ig) razreda G, ki se vežejo na AQP4 na plazemski membrani (69, 71, 72). Ker se večina AQP4 v možganih nahaja na astrocitih, najštevilčnejših celicah glije v možganovini, se večina NMO-IgG veže na astrocite, vežejo pa se tudi na epitelijske celice horoidnega pleteža, ependimske celice ventriklov in v retini na Müllerjeve celice (72, 73). Nekateri bolniki z znaki NMO, ki sodijo v skupino bolnikov z boleznimi iz spektra NMO, nimajo NMO-IgG, imajo pa v 40 % primerov protitelesa proti mielin-skemu oligodendrocitnemu glikoproteinu (74). Obe vrsti protiteles povzročata okvare na podobnih mestih, in sicer v hrbtenjači, anteriorni vidni poti (retini, vidnem živcu, kiazmi, optičnemu traktu) in v manjši meri še na nekaterih mestih v možganih (73).

Zanimivo je, da bolniki lahko tvorijo NMO-IgG že več let pred kliničnimi znaki bolezni. Takšna protitelesa so pri nekaterih bolnikih zaznali 4–16 let pred nastopom bolezni NMO (75). Patogena postanejo takrat, ko dosežejo tarčno tkivo v dovolj visoki koncentraciji in se vežejo na tarčne epitope na zunajcelični strani AQP4. Obenem pa mo-

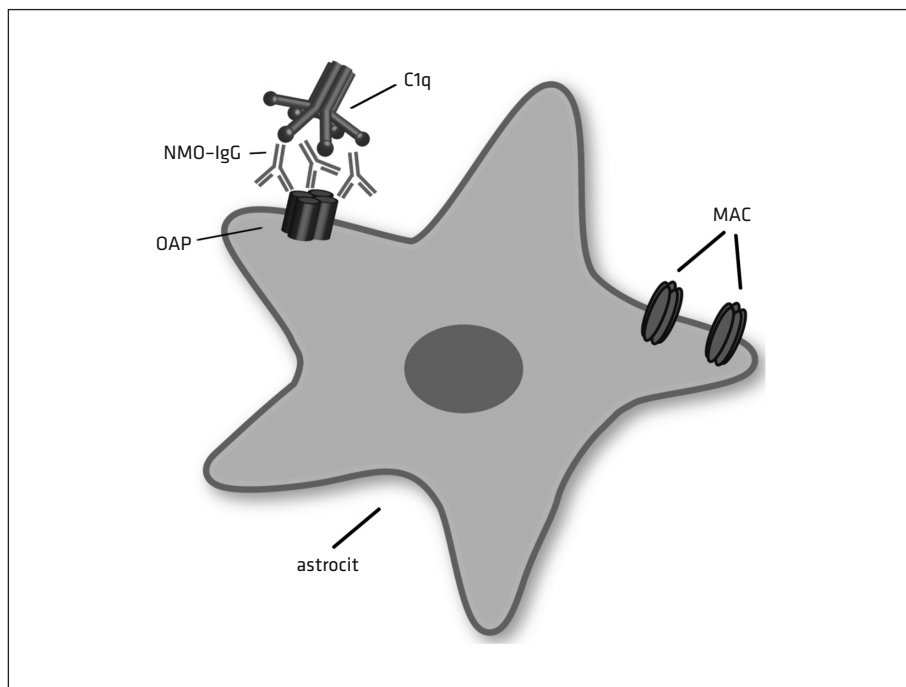
rajo biti v tarčnem tkivu v dovolj velikih količinah prisotni aktivirani efektorski mehanizmi, kot so komplement in aktivirani makrofagi.

Za bolezen NMO je značilno, da najprej propadejo astrociti, temu pa sledi demielinizacija živcev (76, 77). Astrociti postanejo tarče patogenih protiteles proti AQP4 takrat, ko ta med potekom vnetnih procesov vstopijo v OŽS (78). Vstop skozi KMP do možganskega parenhima jim omogočijo limfociti T (79). V OŽS aktivirani limfociti T, ki na svoji površini izražajo označevalec pripadnosti 4 (angl. *cluster of differentiation 4*, CD4), ustvarijo vnetno okolje, kjer NMO-IgG povzroči tvorbo okvar (80). Iz imunohistoloških preparatov je razvidno, da že v začetnih stopnjah aktivnih okvar prihaja do propada astrocitov, kar se kaže kot izguba imunoreaktivnosti proti AQP4 in nevroglijski fibrilarni kisli beljakovini (angl. *glial fibrillary acidic protein*, GFAP), ki je sicer značilno razporejena v astrocitih (67). Obsežen upad v imunoreaktivnosti proti AQP4 in GFAP je opaziti predvsem perivaskularno (67). Na istih mestih se perivaskularno v obliki rozetnega vzorca nalagajo usedline protiteles, makrofagi in aktivirane komponente komplementa (81). Med sestavinami komplementa je označevalec za poškodbo tkiva, izzvano s komplementom (angl. *complement-mediated tissue injury*, C9neo), razporejen v obliki rozete in obroča, druge komponente, kot so C1q, C3, C4, C6, C7, C8 in C9, pa razpršeno. Molekule komplementa, ki se aktivirajo v OŽS, se tam tudi izgrajujejo, zelo verjetno pa prihaja tudi do difuznega prehajanja beljakovin komplementa preko oslabiljene KMP (81, 82). Na osnovi dejstva, da se NMO-IgG ter usedline protiteles in komplementa nahajajo na istih mestih oz. lezijah, se je razvila domneva, da ima NMO-IgG pomembno vlogo za od komplementa odvisno citotoksičnost oz. za od protiteles odvisno prek celic posredovano citotoksičnost. Obe vodita v razgradnjo ali zmanjšano izražanje AQP4 in v propadanje

astrocitov (67, 77). V tkivih bolnikov z NMO so odkrili različne vrste okvar, ki se razlikujejo glede na patologijo astrocitov, demielinizacijo, poškodbo aksonov in vnetje (83).

Kakšno vlogo imajo NMO-IgG pri nastanku in napredku okvar pri NMO, še ni popolnoma razjasnjeno, do zdaj znani izsledki raziskav pa kažejo, da so povezane s propadom astrocitov ob stiku z ožiljem, posledično pa s propadom oligodendrocitov in demielinizacijo živcev. Začetek propadanja astrocitov pri NMO sproži vezava NMO-IgG na OAP na plazemski membrani astrocitov ter aktivacija komplementa (81, 84). Vodne kanalčke AQP4, združene v OAP, prepoznajo molekule komplementa (slika 2).

Ker so v OAP AQP4 združeni v skupke, to bistveno prispeva k uspešni aktivaciji molekul komplementa in sprožanju imunskega odziva od komplementa odvisne citotoksičnosti (84). Kaskada komplementa se začne z vezavo beljakovine komplementa C1q (84). Deli protitelesa, ki lahko kristalizirajo (angl. *fragment crystallizable*, Fc), na globularnih glavah C1q se vežejo na NMO-IgG. Za aktivacijo komplementa C1, ki je sestavljen iz glikoproteinov C1q ter dveh proteaznih proencimov, je potrebna vezava vsaj treh sosednjih NMO-IgG. Aktivacija komplementa sproži klasično pot kaskade komplementa s proizvajanjem kemičnih sredstev, ki privabljajo makrofage, in tvorbo



Slika 2. Vezava nevromielitis optika imunoglobulinov G na ortogonalne skupke delcev na plazemski membrani in aktivacija komplementa vodita v propadanje astrocitov pri bolezni nevromielitis optika. Na posamezne akvaporine 4, ki se na plazmalemii astrocitov združujejo v ortogonalne skupke delcev, se vežejo nevromielitis optika imunoglobulini G. Kaskada komplementa se začne z vezavo sestavine komplementa 1q na nevromielitis optika imunoglobuline G. Ena izmed stopenj v kaskadi komplementa je tvorba skupka beljakovin, ki napadejo membrano, ki se vgradi v membrano celic ter vodi v njihovo razgradnjo. C1q – sestavina komplementa 1q (angl. *complement component 1q*), NMO-IgG – nevromielitis optika imunoglobulin G, OAP – ortogonalni skupki delcev (angl. *orthogonal array of particles*), MAC – skupek beljakovin, ki napadejo membrano (angl. *membrane attack complex*).

skupka beljakovin, ki napadejo membrano (angl. *membrane attack complex*, MAC), ki se vgradi v membrano celic ter vodi v njihov razpad (slika 2). Na regije Fc IgG se vežejo tudi makrofagi, se pri tem aktivirajo in pričnejo sproščati citokine in reaktivne kisikove radikale ter prispevajo k poškodbi tkiva. Končni litični kompleks komplementa MAC se prednostno aktivira perivaskularno, kar dokazuje prisotnost označevalca C9neo ob takih okvarah (81). Komplement nato sproži propadanje oligodendrocitov in demielinizacijo (77, 81). Kljub dokazom o jasnem sovpadanju med demielinizacijo in propadanjem astrocitov je še vedno veliko nejasnosti o natančni povezavi med nedelovanjem nevronov in astrociti ter oligodendrociti, prav tako ni dobro poznana tudi patologija vnetnih procesov.

ZAKLJUČEK

Vodni kanalček AQP4 je pomemben za pospešeno prehajanje molekul vode v smeri koncentracijskega gradienta. Njegova vloga pri prehajanju vode skozi plazmalemo astrocitov je še posebej pomembna v bolezenskih razmerah. Poleg njegove primarne vloge se vse več raziskav usmerja tudi v raziskovanje dodatnih vlog AQP4, kot so npr. vzdrževanje homeostaze kalijevih ionov, kroženje CSF, resorpcija medceličnine, odstranjevanje odpadnih presnovkov, migracija celic in vloga pri vnetnih procesih. Ugotovitve, da se v bolezenskih razmerah izražanje AQP4 na plazmalemi astrocitov spremeni, so uvod v raziskave vzrokov in posledic spremenjenega izražanja AQP4. Poznavanje različnih vlog AQP4 pri patogenezi številnih nevroloških motenj in bolezni, kot je npr. NMO, bi pripomoglo k bolj tarčnemu zdravljenju.

LITERATURA

1. Agre P, Preston GM, Smith BL, et al. Aquaporin chip: The archetypal molecular water channel. *Am J Physiol*. 1993; 265 (4 Pt 2): F463–76.
2. Nagelhus EA, Ottersen OP. Physiological roles of aquaporin-4 in brain. *Physiol Rev*. 2013; 93 (4): 1543–62.
3. Potokar M, Jorgačevski J, Zorec R. Astrocyte aquaporin dynamics in health and disease. *Int J Mol Sci*. 2016; 17 (7): 1121
4. Agre P, Bonhivers M, Borgnia MJ. The aquaporins, blueprints for cellular plumbing systems. *J Biol Chem*. 1998; 273 (24): 14659–62.
5. Badaut J, Fukuda AM, Jullienne A, et al. Aquaporin and brain diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1840 (5): 1554–65.
6. Papadopoulos MC, Manley GT, Krishna S, et al. Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema. *FASEB J*. 2004; 18 (11): 1291–3.
7. Oshio K, Binder DK, Yang B, et al. Expression of aquaporin water channels in mouse spinal cord. *Neuroscience*. 2004; 127 (3): 685–93.
8. Papura V, Heneka MT, Montana V, et al. Glial cells in (patho)physiology. *J Neurochem*. 2012; 121 (1): 4–27.
9. Nielsen S, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, et al. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: High-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci*. 1997; 17 (1): 171–80.
10. Vindedal GF, Thoren AE, Jensen V, et al. Removal of aquaporin-4 from glial and ependymal membranes causes brain water accumulation. *Mol Cell Neurosci*. 2016; 77: 47–52.
11. Nagelhus EA, Veruki ML, Torp R, et al. Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: Polarized expression in müller cells and fibrous astrocytes. *J Neurosci*. 1998; 18 (7): 2506–19.
12. Manley GT, Fujimura M, Ma T, et al. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat Med*. 2000; 6 (2): 159–63.
13. Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP. The molecular basis of water transport in the brain. *Nat Rev Neurosci*. 2003; 4 (12): 991–1001.
14. Mulders SM, van der Kemp AJ, Terlouw SA, et al. The exchange of functional domains among aquaporins with different transport characteristics. *Pflugers Arch*. 1998; 436 (4): 599–607.
15. Moe SE, Sorbo JG, Sogaard R, et al. New isoforms of rat aquaporin-4. *Genomics*. 2008; 91 (4): 367–77.
16. Hasegawa H, Ma T, Skach W, et al. Molecular cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues. *J Biol Chem*. 1994; 269 (8): 5497–500.
17. Lu M, Lee MD, Smith BL, et al. The human aqp4 gene: Definition of the locus encoding two water channel polypeptides in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93 (20): 10908–12.
18. Yang B, Ma T, Verkman AS. Cdna cloning, gene organization, and chromosomal localization of a human mercurial insensitive water channel. Evidence for distinct transcriptional units. *J Biol Chem*. 1995; 270 (39): 22907–13.
19. Neely JD, Christensen BM, Nielsen S, et al. Heterotetrameric composition of aquaporin-4 water channels. *Biochemistry*. 1999; 38 (34): 11156–63.
20. Rossi A, Crane JM, Verkman AS. Aquaporin-4 m/z isoform: Brain expression, supramolecular assembly and neuromyelitis optica antibody binding. *Glia*. 2011; 59 (7): 1056–63.
21. Sørbø JG, Fleckenstein B, Ottersen OP, et al. Small-scale purification and mass spectrometry analysis reveal a third aquaporin-4 protein isoform of 36 kda in rat brain. *J Neurosci Methods*. 2012; 211 (1): 31–9.
22. Potokar M, Stenovec M, Jorgačevski J, et al. Regulation of aqp4 surface expression via vesicle mobility in astrocytes. *Glia*. 2013; 61 (6): 917–28.
23. Crane JM, Van Hoek AN, Skach WR, et al. Aquaporin-4 dynamics in orthogonal arrays in live cells visualized by quantum dot single particle tracking. *Mol Biol Cell*. 2008; 19 (8): 3369–78.
24. Rash JE, Yasumura T, Hudson CS, et al. Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95 (20): 11981–6.
25. Potokar M, Vardjan N, Stenovec M, et al. Astrocytic vesicle mobility in health and disease. *Int J Mol Sci*. 2013; 14 (6): 11238–58.
26. De Bellis M, Pisani F, Mola MC, et al. A novel human aquaporin-4 splice variant exhibits a dominant-negative activity: A new mechanism to regulate water permeability. *Mol Biol Cell*. 2014; 25 (4): 470–80.
27. Jung JS, Bhat RV, Preston GM, et al. Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: Candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91 (26): 13052–6.

28. Cheng A, van Hoek AN, Yeager M, et al. Three-dimensional organization of a human water channel. *Nature*. 1997; 387 (6633): 627–30.
29. Landis DM, Reese TS. Arrays of particles in freeze-fractured astrocytic membranes. *J Cell Biol*. 1974; 60 (1): 316–20.
30. Frigeri A, Gropper MA, Umenishi F, et al. Localization of miwc and glip water channel homologs in neuromuscular, epithelial and glandular tissues. *J Cell Sci*. 1995; 108 (Pt 9): 2993–3002.
31. Furman CS, Gorelick-Feldman DA, Davidson KG, et al. Aquaporin-4 square array assembly: Opposing actions of m1 and m23 isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100 (23): 13609–14.
32. Rash JE, Davidson KG, Yasumura T, et al. Freeze-fracture and immunogold analysis of aquaporin-4 (aqp4) square arrays, with models of aqp4 lattice assembly. *Neuroscience*. 2004; 129 (4): 915–34.
33. Wolburg H. Orthogonal arrays of intramembranous particles: A review with special reference to astrocytes. *J Hirnforsch*. 1995; 36 (2): 239–58.
34. Sorbo JG, Moe SE, Ottersen OP, et al. The molecular composition of square arrays. *Biochemistry*. 2008; 47 (8): 2631–7.
35. Tajima M, Crane JM, Verkman AS. Aquaporin-4 (aqp4) associations and array dynamics probed by photobleaching and single-molecule analysis of green fluorescent protein-aqp4 chimeras. *J Biol Chem*. 2010; 285 (11): 8163–70.
36. Crane JM, Verkman AS. Determinants of aquaporin-4 assembly in orthogonal arrays revealed by live-cell single-molecule fluorescence imaging. *J Cell Sci*. 2009; 122 (Pt 6): 813–21.
37. Crane JM, Bennett JL, Verkman AS. Live cell analysis of aquaporin-4 m1/m23 interactions and regulated orthogonal array assembly in glial cells. *J Biol Chem*. 2009; 284 (51): 35850–60.
38. Iliff JJ, Wang M, Liao Y, et al. A paravascular pathway facilitates csf flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci Transl Med*. 2012; 4 (147): 147ra11.
39. Silberstein C, Bouley R, Huang Y, et al. Membrane organization and function of m1 and m23 isoforms of aquaporin-4 in epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004; 287 (3): F501–11.
40. Hiroaki Y, Tani K, Kamegawa A, et al. Implications of the aquaporin-4 structure on array formation and cell adhesion. *J Mol Biol*. 2006; 355 (4): 628–39.
41. Zelenina M. Regulation of brain aquaporins. *Neurochem Int*. 2010; 57 (4): 468–88.
42. McCoy ES, Haas BR, Sontheimer H. Water permeability through aquaporin-4 is regulated by protein kinase c and becomes rate-limiting for glioma invasion. *Neuroscience*. 2010; 168 (4): 971–81.
43. Yamamoto N, Sobue K, Miyachi T, et al. Differential regulation of aquaporin expression in astrocytes by protein kinase c. *Brain Res Mol Brain Res*. 2001; 95 (1–2): 110–6.
44. Rossi A, Baumgart F, van Hoek AN, et al. Post-golgi supramolecular assembly of aquaporin-4 in orthogonal arrays. *Traffic*. 2012; 13 (1): 43–53.
45. Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin water channels in the nervous system. *Nat Rev Neurosci*. 2013; 14 (4): 265–77.
46. Hladky SB, Barrand MA. Mechanisms of fluid movement into, through and out of the brain: Evaluation of the evidence. *Fluids Barriers CNS*. 2014; 11 (1): 26.
47. Fischbarg J, Kuang KY, Vera JC, et al. Glucose transporters serve as water channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87 (8): 3244–7.
48. MacAulay N, Zeuthen T. Water transport between cns compartments: Contributions of aquaporins and cotransporters. *Neuroscience*. 2010; 168 (4): 941–56.
49. Haj-Yasein NN, Vindedal GF, Eilert-Olsen M, et al. Glial-conditional deletion of aquaporin-4 (aqp4) reduces blood-brain water uptake and confers barrier function on perivascular astrocyte endfeet. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108 (43): 17815–20.
50. Solenov E, Watanabe H, Manley GT, et al. Sevenfold-reduced osmotic water permeability in primary astrocyte cultures from aqp-4-deficient mice, measured by a fluorescence quenching method. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004; 286 (2): C426–32.
51. Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin-4 gene disruption in mice reduces brain swelling and mortality in pneumococcal meningitis. *J Biol Chem*. 2005; 280 (14): 13906–12.
52. Badaut J, Ashwal S, Adami A, et al. Brain water mobility decreases after astrocytic aquaporin-4 inhibition using rna interference. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011; 31 (3): 819–31.
53. Verkman AS. Aquaporins in clinical medicine. *Annu Rev Med*. 2012; 63: 303–16.
54. Hoffmann EK, Lambert IH, Pedersen SF. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol Rev*. 2009; 89 (1): 193–277.

55. Pasantes-Morales H, Lezama RA, Ramos-Mandujano G, et al. Mechanisms of cell volume regulation in hypo-osmolality. *Am J Med.* 2006; 119 (7 Suppl 1): S4–11.
56. Mola MG, Sparaneo A, Gargano CD, et al. The speed of swelling kinetics modulates cell volume regulation and calcium signaling in astrocytes: A different point of view on the role of aquaporins. *Glia.* 2016; 64 (1): 139–54.
57. Lisjak M, Potokar M, Rituper B, et al. Aqp4e-based orthogonal arrays regulate rapid cell volume changes in astrocytes. *J Neurosci.* 2017; 37 (44): 10748–56.
58. Moftakhar P, Lynch MD, Pomakian JL, et al. Aquaporin expression in the brains of patients with or without cerebral amyloid angiopathy. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2010; 69 (12): 1201–9.
59. Hoshi A, Yamamoto T, Shimizu K, et al. Characteristics of aquaporin expression surrounding senile plaques and cerebral amyloid angiopathy in alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2012; 71 (8): 750–9.
60. Rodríguez A, Pérez-Gracia E, Espinosa JC, et al. Increased expression of water channel aquaporin 1 and aquaporin 4 in creutzfeldt-jakob disease and in bovine spongiform encephalopathy-infected bovine-prp transgenic mice. *Acta Neuropathol.* 2006; 112 (5): 573–85.
61. Aoki-Yoshino K, Uchihara T, Duyckaerts C, et al. Enhanced expression of aquaporin 4 in human brain with inflammatory diseases. *Acta Neuropathol.* 2005; 110 (3): 281–8.
62. Aoki K, Uchihara T, Tsuchiya K, et al. Enhanced expression of aquaporin 4 in human brain with infarction. *Acta Neuropathol.* 2003; 106 (2): 121–4.
63. Saadoun S, Papadopoulos MC, Davies DC, et al. Aquaporin-4 expression is increased in oedematous human brain tumours. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2002; 72 (2): 262–5.
64. Badaut J, Brunet JF, Grollmund L, et al. Aquaporin 1 and aquaporin 4 expression in human brain after subarachnoid hemorrhage and in peritumoral tissue. *Acta Neurochir Suppl.* 2003; 86: 495–8.
65. Lee TS, Eid T, Mane S, et al. Aquaporin-4 is increased in the sclerotic hippocampus in human temporal lobe epilepsy. *Acta Neuropathol.* 2004; 108 (6): 493–502.
66. Eid T, Lee TS, Thomas MJ, et al. Loss of perivascular aquaporin 4 may underlie deficient water and k+ homeostasis in the human epileptogenic hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102 (4): 1193–8.
67. Misu T, Fujihara K, Kakita A, et al. Loss of aquaporin 4 in lesions of neuromyelitis optica: Distinction from multiple sclerosis. *Brain.* 2007; 130 (Pt 5): 1224–34.
68. Weinshenker BG, Wingerchuk DM, Pittock SJ, et al. Nmo-igg: A specific biomarker for neuromyelitis optica. *Dis Markers.* 2006; 22 (4): 197–206.
69. Wingerchuk DM, Lennon VA, Lucchinetti CF, et al. The spectrum of neuromyelitis optica. *Lancet Neurol.* 2007; 6 (9): 805–15.
70. Waters P, Jarius S, Littleton E, et al. Aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica and longitudinally extensive transverse myelitis. *Arch Neurol.* 2008; 65 (7): 913–9.
71. Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: Distinction from multiple sclerosis. *Lancet.* 2004; 364 (9451): 2106–12.
72. Lennon VA, Kryzer TJ, Pittock SJ, et al. Igg marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J Exp Med.* 2005; 202 (4): 473–7.
73. Bradl M, Reindl M, Lassmann H. Mechanisms for lesion localization in neuromyelitis optica spectrum disorders. *Curr Opin Neurol.* 2018; 31 (3): 325–33.
74. Hamid SHM, Whittam D, Mutch K, et al. What proportion of aqp4-igg-negative nmo spectrum disorder patients are mog-igg positive? A cross sectional study of 132 patients. *J Neurol.* 2017; 264 (10): 2088–94.
75. Leite MI, Coutinho E, Lana-Peixoto M, et al. Myasthenia gravis and neuromyelitis optica spectrum disorder: A multicenter study of 16 patients. *Neurology.* 2012; 78 (20): 1601–7.
76. Weber MS, Derfuss T, Metz I, et al. Defining distinct features of anti-mog antibody associated central nervous system demyelination. *Ther Adv Neurol Disord.* 2018; 11: 1756286418762083.
77. Parratt JD, Prineas JW. Neuromyelitis optica: A demyelinating disease characterized by acute destruction and regeneration of perivascular astrocytes. *Mult Scler.* 2010; 16 (10): 1156–72.
78. Zeka B, Hastermann M, Hochmeister S, et al. Highly encephalitogenic aquaporin 4-specific t cells and nmo-igg jointly orchestrate lesion location and tissue damage in the CNS. *Acta Neuropathol.* 2015; 130 (6): 783–98.
79. Bradl M, Misu T, Takahashi T, et al. Neuromyelitis optica: Pathogenicity of patient immunoglobulin in vivo. *Ann Neurol.* 2009; 66 (5): 630–43.
80. Pohl M, Kawakami N, Kitić M, et al. T cell-activation in neuromyelitis optica lesions plays a role in their formation. *Acta Neuropathol Commun.* 2013; 1: 85.

81. Lucchinetti CF, Mandler RN, McGavern D, et al. A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica. *Brain*. 2002; 125 (Pt 7): 1450-61.
82. Veerhuis R, Nielsen HM, Tenner AJ. Complement in the brain. *Mol Immunol*. 2011; 48 (14): 1592-603.
83. Misu T, Höftberger R, Fujihara K, et al. Presence of six different lesion types suggests diverse mechanisms of tissue injury in neuromyelitis optica. *Acta Neuropathol*. 2013; 125 (6): 815-27.
84. Phuan PW, Ratelade J, Rossi A, et al. Complement-dependent cytotoxicity in neuromyelitis optica requires aquaporin-4 protein assembly in orthogonal arrays. *J Biol Chem*. 2012; 287 (17): 13829-39.

Prispelo 19. 10. 2018