



**Akwaporyny ślimaka winniczka *Helix pomatia* L.
– identyfikacja, charakterystyka i znaczenie w procesie
zapadania w stan estywacji**

Ewa Kosicka

Rozprawa doktorska wykonana
w Zakładzie Biologii Komórki
pod kierunkiem
prof. UAM dr. hab. Andrzeja Lesickiego (promotor)
oraz dr Joanny Pieńkowskiej (promotor pomocniczy)

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	6
1.1. Wprowadzenie	6
1.2. Struktura akwaporyn	6
1.3. Selektywność akwaporyn	7
1.4. Klasyfikacja akwaporyn	10
1.2.1. Akwaporyny typu AQP1	12
1.2.2. Akwaporyny typu AQP8	12
1.2.3. Akwaporyny typu AQP3	13
1.2.4. Akwaporyny typu AQP11	14
1.2.5. Akwaporyny nieklasyfikujące się do czterech głównych typów	15
1.5. Akwaporyny mięczaków	17
1.6. Akwaporyny jako element odpowiedzi na stres środowiskowy	18
1.7. Estywacja jako złożona strategia obrony przed stresem środowiskowym	20
1.8. Obiekt badań: ślimak winniczek <i>Helix pomatia</i> L.	21
2. CEL PRACY	23
3. MATERIAŁY	24
3.1. Materiał biologiczny	24
3.1.1. Ślimak winniczek <i>Helix pomatia</i> L.	24
3.1.2. Bakterie <i>Escherichia coli</i>	24
3.1.3. Drożdże <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
3.2. Zestawy odczynników	24
3.3. Enzymy	25
3.4. Startery	25
3.4.1. Startery do reakcji 5' i 3' RACE	25
3.4.2. Startery do reakcji Real-Time PCR	26
3.4.3. Startery do przygotowania konstruktów	26
3.4.4. Inne startery wykorzystywane w badaniach	27
3.5. Bufory	27
3.6. Plazmidy	27
3.7. Pożywki	27
3.7.1. Pożywki do hodowli bakterii	27
3.7.2. Pożywki do hodowli drożdży	28
3.8. Pozostałe odczynniki	29
4. METODY	30
4.1. Izolacja narządów	30
4.2. Izolacja RNA	30
4.2.1. Izolacja RNA z wykorzystaniem odczynnika TriReagent	30
4.2.2. Izolacja RNA z wykorzystaniem kolumnienek	31
4.3. Odwrotna transkrypcja	31
4.4. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)	32
4.4.1. Standardowa amplifikacja DNA	32

4.4.2. Metoda szybkiego powielenia końców cDNA (Rapid Amplification of cDNA Ends - RACE)	33
4.4.3. PCR Touch Up	34
4.4.4. PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR)	35
4.5. Elektroforeza kwasów nukleinowych	35
4.6. Oczyszczanie DNA	35
4.6.1. Oczyszczanie produktów PCR z żelu agarozowego	35
4.6.2. Oczyszczanie DNA z mieszaniny reakcyjnej	36
4.7. Powielanie produktów PCR metodą transformacji komórek bakteryjnych	36
4.7.1. Klonowanie i transformacja z wykorzystaniem wektora TOPO	36
4.7.2. Klonowanie i transformacja z wykorzystaniem wektora pYX142	36
4.8. Izolacja plazmidów	37
4.9. Transformacja komórek drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38
4.10. Testy funkcjonalności akwaporyn	38
4.10.1. Transport wody	38
4.10.2. Transport nadtlenu wodoru	39
4.10.3. Transport glicerolu	39
4.11. Analiza bioinformatyczna	40
4.11.1. Identyfikacja otwartych ramek odczytu w sekwencjach nukleotydowych otrzymanych w wyniku sekwencjonowania transkryptomu	40
4.11.2. Translacja <i>in silico</i> i zestawienie sekwencji aminokwasowych	40
4.11.3. Charakterystyka sekwencji aminokwasowych	40
4.11.4. Modelowanie struktury przestrzennej białek	41
4.11.5. Analiza filogenetyczna	41
4.12. Statystyczna analiza danych	42
4.13. Usługi	42
5. WYNIKI	43
5.1. Identyfikacja sekwencji nukleotydowych kodujących akwaporyny ślimaka winniczka	43
5.2. Charakterystyka bioinformatyczna sekwencji aminokwasowych akwaporyn otrzymanych <i>in silico</i>	46
5.2.1. Translacja <i>in silico</i> sekwencji kodujących akwaporyny	46
5.2.2. Identyfikacja motywów strukturalnych charakterystycznych dla akwaporyn	47
5.2.3. Określenie profilu hydrofobowości	48
5.2.4. Modelowanie struktury przestrzennej	49
5.2.5. Wyznaczenie potencjalnych miejsc modyfikacji potranslacyjnej akwaporyn	52
5.2.6. Analiza filogenetyczna	53
5.3. Wyznaczenie profilu organo-specyficznej ekspresji genów kodujących akwaporyny	55
5.4. Określenie funkcjonalności przewidywanych białek HpAQP w komórkach drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58
5.4.1. Otrzymanie konstruktów HpAQP1-6 do transformacji komórek drożdży <i>S. cerevisiae</i>	58

5.4.2. Zdolności transportowe HpAQP1-6 określone na podstawie testów komplementacji przeprowadzonych w komórkach drożdży <i>S. cerevisiae</i>	59
5.5. Weryfikacja fizjologicznej roli zidentyfikowanych białek.....	63
5.5.1. Opracowanie warunków eksperymentu metodą PCR w czasie rzeczywistym	63
5.5.2. Wyznaczenie zmian poziomu ekspresji genów kodujących akwaporyny w trakcie zapadania ślimaka w stan estywacji.....	64
6. DYSKUSJA	67
7. STRESZCZENIE.....	78
8. ABSTRACT	80
9. LITERATURA	83

STOSOWANE SKRÓTY

AQP	–	akwaporyna
ar/R	–	aminokwas aromatyczny/arginina
BIB	–	z ang. Big Brain integral proteins
dATP	–	deoksyadenozynotrifosforan
dNTP	–	mieszanina deoksynukleotydów
DRIP	–	z ang. Drosophila Integral Proteins
DTT	–	ditiotreitol
EDTA	–	etylenodwuaminoczteroocjan
Eglp	–	entomogliceroporyny
GIP	–	z ang. GlpF-like Intrinsic Proteins
GlpF	–	akwaporyna transportująca glicerol występująca u <i>Escherichia coli</i>
HIP	–	z ang. Hybrid Intrinsic Proteins
Maqp	–	malakoakwaporyny
Mglp	–	malakogliceroporyny
MIP	–	Major Intrinsic Proteins
NIP	–	z ang. Nodulin 26-Like Intrinsic Proteins
NPA	–	motyw aminokwasowy asparagina, prolina, alanina
PIP	–	z ang. Plasma Membrane Intrinsic Proteins
PRIP	–	z ang. <i>Pyrocoelia rufa</i> Integral Proteins
SIP	–	z ang. Small Basic Intrinsic Proteins
UTR	–	rejony niepodlegające translacji
TIP	–	z ang. Tonoplast Intrinsic Proteins
TRIS	–	3-hydroksymetyloaminoocjan
XIP	–	z ang. X Intrinsic Proteins

1. WSTĘP

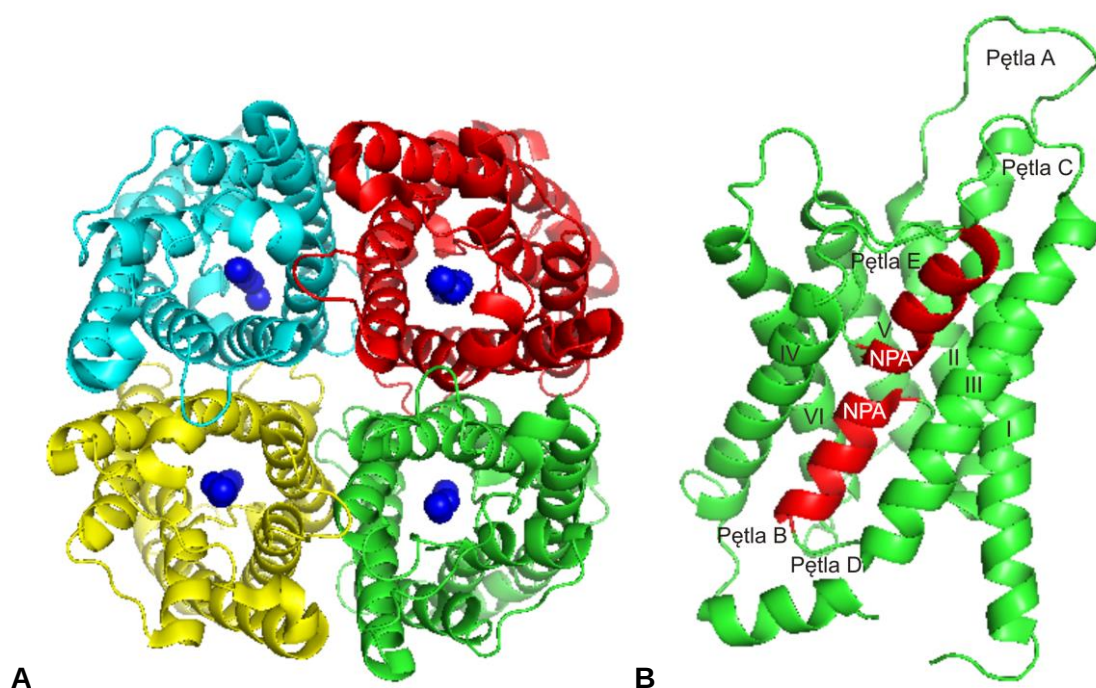
1.1. Wprowadzenie

Jednym z najistotniejszych mechanizmów pozwalających organizmom opanować środowisko lądowe jest zdolność ochrony przed wysychaniem i odwodnieniem. Komórki składają się w około 70% z wody, a przebiegające w nich reakcje metaboliczne uzależnione są od jej obecności. Zatem woda jest składnikiem niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania komórek i w konsekwencji gwarantującym homeostazę całego organizmu (Schmidt-Nielsen 2008). Istotnym elementem biorącym udział w zachowaniu tego stanu są akwaporyny, czyli białka budujące kanały wodne, mające zdolność dwukierunkowego transportu wody zgodnie z gradientem stężeń (Agre i in. 1993). Ich odkrycie w 1992 roku przez Petera Agre zmieniło definicję transportu wody przez błony biologiczne z procesu biernego i niepodlegającego kontroli na ściśle regulowany transport, uzależniony od struktury kanału (Preston i in. 1992). Występowanie akwaporyn zostało udokumentowane u organizmów prokariotycznych i eukariotycznych, a ich znaczenie dla prawidłowego przebiegu procesów fizjologicznych organizmów wielokomórkowych obecnie już nie budzi wątpliwości (Hohmann i in. 2000; Kitchen i in. 2015; Maurel i in. 2015; Sabir i in. 2016; Von Bülow i Beitz 2015). Między wieloma istotnymi funkcjami fizjologicznymi pełnionymi przez akwaporyny warto wspomnieć o istotnej roli, jaką pełnią w procesie estywacji, stanowiącym odpowiedź zwierząt bezkręgowych na stres związany z ograniczeniem dostępu do wody, bądź jej brakiem (Suzuki i in. 2007; Verkman 2011).

1.2. Struktura akwaporyn

Akwaporyny należą do grupy białek MIP (ang. Major Intrinsic Proteins) i są jednymi z najlepiej scharakteryzowanych białek błonowych (Verma i in. 2015). Funkcjonują one w błonach biologicznych jako tetrametry, w obrębie których każdy monomer tworzy pojedynczy por dla wody (Ryc. 1A). Każdy monomer to łańcuch polipeptydowy o długości około 280 aminokwasów i masie zbliżonej do 30 kDa. W dwuwarstwie lipidowej tworzy on sześć domen transbłonowych o strukturze helisy α (I-VI) i pięć pętli (dwie wewnątrzkomórkowe – B i D oraz trzy zewnątrzkomórkowe – A, C i E), a jego koniec aminowy (-N) i karboksylowy (-C) zlokalizowane są po stronie cytoplazmatycznej (Kreida i Törnroth-Horsefield 2015). Dodatkowo w obrębie pętli B i E formują się krótkie helisy α , które złożone razem tworzą siódmą pseudo-domenę transbłonową (Ryc. 1B). W aminokwasowej sekwencji obu tych helis znajdują się dwa

konserwatywne motywy NPA (asparagina-prolina-alanina), które łączą się ze sobą dzięki oddziaływaniom Van der Waalsa, tworzą pierścień w centralnej części poru. Jest to jeden z elementów struktury odpowiedzialny za selektywność transportu (Sui i in. 2001). Drugim elementem jest region ar/R zwany również filtrem selektywności, zbudowany z czterech aminokwasów, z których przynajmniej jeden jest dowolnym aminokwasem aromatycznym, a jeden jest arginina. Dwa z budujących go aminokwasów znajdują się w domenach H2 i H5, a kolejne dwa zlokalizowane są w pętli E. Ich łańcuchy boczne, zlokalizowane powyżej pierścienia uformowanego przez motywy NPA, skierowane są do wnętrza poru i tworzą jego najwęższe miejsce (Ryc. 2). Jednakże łańcuchy boczne, które ograniczają średnicę poru, nie są jedynym czynnikiem decydujących o selektywności transportu. Drugą ważną cechą jest polarność aminokwasów budujących region ar/R (Hub i de Groot 2008).



Ryc. 1. (A) Kanał wodny zbudowany z czterech monomerów (zaznaczone kolorem zielonym, żółtym, niebieskim i czerwonym), z których każdy zawiera pojedynczy por dla wody (woda przedstawiona, jako granatowy element graficzny); (B) Schemat budowy monomeru z zaznaczonymi domenami transbłonowymi (I-VI) oraz pętlami (A-E). Krótkie helisy, tworzące siódmą pseudodomenę, zaznaczono kolorem czerwonym

1.3. Selektywność akwaporyn

Jak wspomniano powyżej, kluczową rolę w determinacji selektywności akwaporyn odgrywają motywy NPA i region ar/R. Wśród dotychczas zidentyfikowanych akwaporyn najbardziej konserwatywne są obie asparaginy w każdym z dwóch motywów NPA.

W pozycji drugiej zidentyfikowano podstawienia, ale są one tak częste jak zmienność ostatniego aminokwasu. W miejscu alaniny może występować seryna, walina czy izoleucyna (Wree i in. 2010).

Obecnie wyróżnia się dwa podstawowe rodzaje regionu ar/R, które decydując o średnicy największego miejsca kanału w istotny sposób przyczyniają się do obserwowanej selektywności akwaporyn (Wang i in. 2005). Związany z tym jest podział tych białek na dwie podrodziny - ortodoksyjne akwaporyny, budujące kanały wodne wysoce selektywne w stosunku do wody, i akwagliceroporyny, które poza wodą transportują również większe cząsteczki, takie jak glicerol (Hub i de Groot 2008).

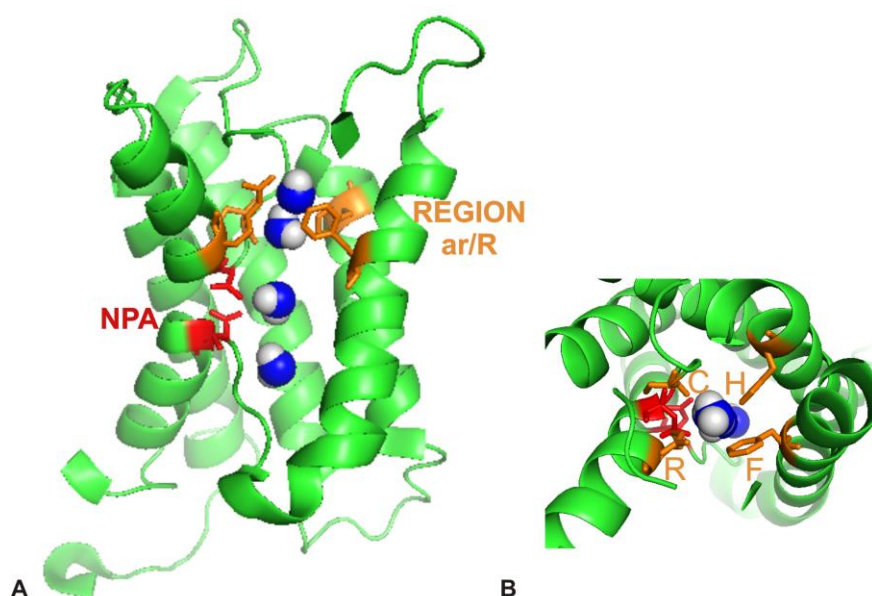
W przypadku ortodoksyjnych akwaporyn, najlepiej zbadaną jest ludzka akwaporyna 1 (hAQP1), której region ar/R zbudowany jest z fenyloalaniny, histydyny, argininy oraz cysteiny (Ryc. 2). W miejscu tym por ma średnicę 3 Å, podczas gdy cząsteczka wody ma 2.8 Å. Tym samym średnica poru wymusza transport wody w postaci pojedynczych cząsteczek (Sui i in. 2001). Poza tym histydyna, arginina oraz cysteina zapewniają powstanie hydrofilowej powierzchni, naprzeciwko której występuje hydrofobowa fenyloalanina. Takie środowisko wspomaga transport cząsteczki o dipolowym charakterze, takiej jak cząsteczka wody (Kosinska-Eriksson i in. 2013).

Z kolei najlepiej zbadanym białkiem reprezentującym akwagliceroporyny jest GlpF zidentyfikowana u *Escherichia coli*, którego region ar/R zbudowany jest z tryptofanu, glicyny, alaniny i argininy (Hénin i in. 2008). Podstawienie glicyną typowej dla ortodoksyjnych akwaporyn histydyny, oraz występowanie małego aminokwasu tj. alaniny, zwiększa średnicę poru do 3.3 Å. Umożliwia to transport glicerolu nie tylko ze względu na poszerzoną średnicę, ale także na skutek zmiany polarności aminokwasów w kierunku reszt o bardziej hydrofobowym charakterze (Lee i in. 2004). Co istotne, pomimo większej średnicy poru, akwagliceroporyny transportują wodę znacznie wolniej i mniej wydajnie, niż ortodoksyjne akwaporyny (Jensen i in. 2001).

Wymienione dwa rodzaje regionów ar/R nie są jedynymi, jakie można zidentyfikować wśród akwaporyn (Verma i in. 2015). Pomimo, że nazwa tego regionu związana jest z występowaniem aminokwasu aromatycznego, to istnieją akwaporyny, które nie posiadają go w tym regionie (Verma i in. 2015). W białkach tych w miejscu reszty aromatycznej występują aminokwasy takie, jak alanina, walina, leucyna oraz izoleucyna. Najlepiej przebadaną grupą akwaporyn, w której nie zawsze występuje aminokwas aromatyczny w regionie ar/R są roślinne białka NIP. Budowane przez nie kanały wodne cechuje możliwość transportowania wielu różnych substancji, takich jak glicerol, arsen, mocznik oraz nadtlenek wodoru często z ograniczonym lub nawet wykluczonym transportem wody (Mitani-Ueno i in. 2011). Niestety, brak jest danych krystalograficznych, które mogłyby odpowiedzieć na pytanie, jaki mechanizm

selektywności występuje w tych białkach. Co ciekawe, region ar/R o takim samym lub bardzo podobnym składzie aminokwasowym zidentyfikowano u nowo poznanej grupy akwaporyn Aqp14 (Finn i in 2014). Białka te występują u kręgowców, ryb, płazów oraz torbaczy. Brak jest informacji na temat substancji, jakie transportują, natomiast analiza filogenetyczna sugeruje, że białka te należą do grupy ortodoksyjnych akwaporyn, transportujących głównie wodę. Tym samym, znajomość składu aminokwasowego regionu ar/R nie zawsze umożliwia odpowiedź na pytanie, jakie substancje może transportować dane białko (Finn i in 2014).

Jak wspomniano wcześniej, podstawowy podział akwaporyn oparty jest na ich zdolności transportu wody i glicerolu, przy czym nie wyklucza to możliwości transportu innych substancji. Zarówno wśród akwaporyn ortodoksyjnych, jak i akwagliceroporyn występują białka transportujące na przykład mocznik, nadtlenek wodoru, związki azotu czy dwutlenek węgla (Assentoft i in. 2016; Bienert i Chaumont 2014; Endeward i in. 2006; Li i Wang 2014). W przeciwieństwie jednak do wody i glicerolu, nie jest znany dokładny mechanizm selektywności transportu tych substancji. W przypadku dwutlenku węgla do tej pory nie udało się nawet ustalić czy transport ten przebiega wewnątrz poru wodnego, czy też poprzez oś tetrameru utworzoną pomiędzy połączonymi czterema monomerami (Herrera i Garvin 2011). Także w przypadku nadtlenu wodoru sugeruje się mechanizm transportu niezwiązany ze strukturą regionu ar/R (Bienert i Chaumont 2014).



Ryc. 2. Schemat transportu wody przez por (A) Przekrój podłużny przez kanał ukazujący dwa regiony istotne dla selektywności transportu – region ar/R (kolor pomarańczowy) oraz asparaginy z motywów NPA (kolor czerwony); (B) Przekrój poprzeczny przez kanał z zaznaczonymi aminokwasami budującymi największe miejsce poru, czyli region ar/R (F – fenyloalanina, H – histydyna, C – cysteina, R – arginina)

1.4. Klasyfikacja akwaporyn

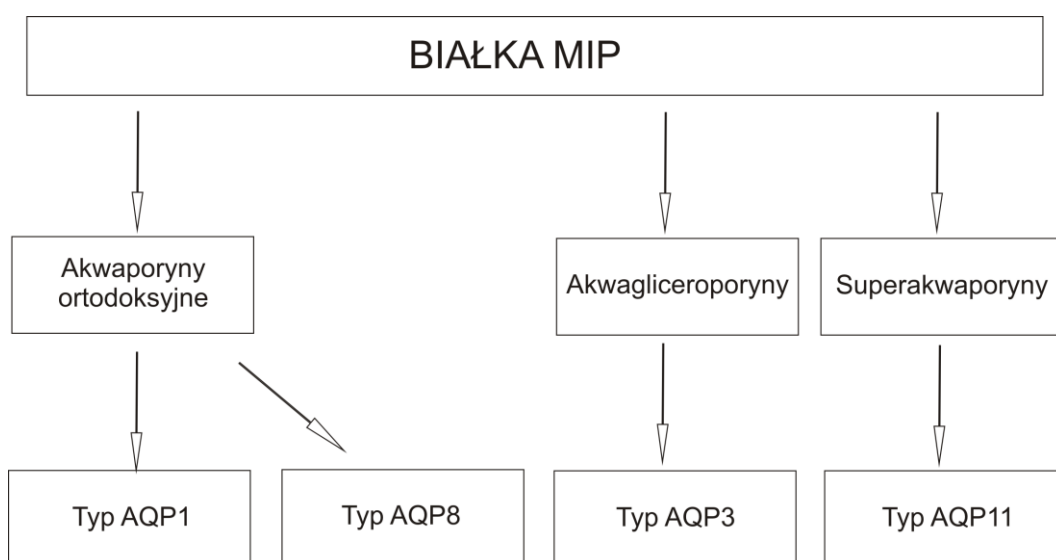
Od momentu identyfikacji ludzkiej akwaporyny-1 (AQP1), zidentyfikowano tysiące innych białek należących do rodziny MIP u organizmów reprezentujących różne grupy taksonomiczne (Ishibashi i in. 2017). Ponadto, w jednym organizmie może występować od kilku do kilkudziesięciu ortologów tych białek (Dong i in. 2016). Na przykład, u człowieka zidentyfikowano 13 akwaporyn, które oznaczono AQP0-AQP12 (Takata i in. 2004). Wśród bezkręgowców najlepiej przebadane pod kątem akwaporyn są stawonogi (wśród nich głównie owady), nicienie oraz niesporczaki (Benoit i in. 2014; Grohme i in. 2013; Huang i in. 2007). Jednak dostępne dane dotyczą najczęściej tylko pojedynczych białek z danego organizmu (Ball i in. 2009; Spring i in. 2007; Wallace i in. 2012). Dokładniejsze opracowania dotyczące kilku akwaporyn jednego gatunku zostały dotychczas przeprowadzone tylko dla kilku przedstawicieli owadów: komara *Aedes aegypti* (Drake i in. 2010), miodówki *Bactericera cockerelli* (Ibanez i in. 2014), wszy *Lepeophtheirus salmonis* (Stavang i in. 2015), pluskwiaka *Lygus hesperus* (Fabrick i in. 2014), mączlika *Bemisia tabaci* (Van Ekert i in. 2016) oraz muszki *Drosophila melanogaster* (Kaufmann i in. 2005).

Początkowo akwaporyny podzielono na dwie podrodziny – akwaporyny ortodoksyjne i akwagliceroporyny (Verkman i Mitra 2000). Podział ten zdawał się być trafny, bo nawet u bakterii u bakterii *E. coli* zidentyfikowano dwa białka o takich właśnie aktywnościach, tj. AqpZ, które odpowiada akwaporynom ortodoksyjnym oraz GlpF, które transportuje wodę i glicerol (Calamita i in. 1995; Maurel i in. 1994). W toku dalszych badań okazało się jednak, że taki podział jest niepełny. W miarę identyfikacji coraz większej liczby sekwencji kodujących akwaporyny, pochodzących z sekwencjonowania genomów i transkryptomów najróżniejszych organizmów okazało się, że część kodowanych białek nie mieści się w takiej klasyfikacji. W związku z tym zaproponowano wyróżnienie nowej grupy akwaporyn. Jako pierwszą wyodrębniono grupę nazywaną superakwaporynami (Ishibashi 2006). Ich cechą charakterystyczną jest duża zmienność w obrębie motywów NPA oraz niskie podobieństwo sekwencji aminokwasowej do innych akwaporyn (identyczność <15%). Przedstawiciele tej grupy nie występują u bakterii oraz jednokomórkowych eukariontów, co sugeruje, że jest to grupa ewolucyjnie młodsza od grupy akwaporyn ortodoksyjnych i akwagliceroporyn. Część badaczy wyróżnia tylko te trzy grupy akwaporyn (Benga 2012; Ishibashi i in. 2017), podczas gdy inni wyróżniają cztery grupy: akwaporyny ortodoksyjne nazywane typem AQP1, akwagliceroporyny nazywane typem AQP3, superakwaporyny oznaczone jako typ AQP11 oraz wyróżniają dodatkową grupę - typ AQP8 (Finn i Cerdà 2015a; Soto i in. 2012) (Ryc. 3). Białka

zaliczane do ostatniej grupy posiadają charakterystyczny skład regionu ar/R, z histydyną w pierwszej pozycji, wykazują lokalizację wewnątrzkomórkową oraz dodatkowo transportują amoniak (Abascal i in. 2014; Molinas i in. 2012). Ponadto, sekwencje aminokwasowe akwaporyn grupy typu AQP8 są na tyle odmienne od pozostałych, że na drzewie filogenetycznym tworzą osobną grupę (Abascal i in 2014). Grupa ta, podobnie jak grupa typu AQP11 nie ma swojego odpowiednika u bakterii, co może sugerować jej późniejsze pojawienie się w toku ewolucji (Ryc. 3).

W wyniku wielokrotnej poliploidyzacji genomu, u roślin występuje duża różnorodność akwaporyn (Azad i in. 2016). U roślin wyższych liczba rodzajów białek budujących kanały wodne przekracza 30, a może nawet osiągać liczbę 66, jak u soi *Glycine clandestina*, czy 71 u bawełny *Gossypium hirsutum* (Maurel i in. 2015).

Klasyfikacja akwaporyn roślinnych oparta jest na podobieństwie sekwencji aminokwasowej oraz lokalizacji w komórce. W konsekwencji dzieli się je na siedem grup: PIP (z ang. Plasma Membrane Intrinsic Proteins), TIP (z ang. Tonoplast Intrinsic Proteins), NIP (z ang. Nodulin 26-Like Intrinsic Proteins), SIP (z ang. Small Basic Intrinsic Proteins), XIP (z ang. X Intrinsic Proteins), HIP (z ang. Hybrid Intrinsic Proteins) oraz GIP (z ang. GlpF-like Intrinsic Proteins) (Azad i in. 2016). Pierwsze cztery grupy, odpowiadają grupom wyróżnionym dla kręgowców (Perez Di Giorgio i in. 2014), natomiast trzy pozostałe nie mające swoich odpowiedników u kręgowców, obejmują białka zidentyfikowane tylko u mszaków i roślin zarodnikowych (Danielson i Johanson 2008) (Ryc. 4).



Ryc. 3. Podział akwaporyn na trzy grupy - akwaporyny ortodoksyjne, akwagliceroporyny i superakwaporyny (Benga 2012; Ishibashi i in. 2017) oraz odpowiadające im cztery typy - AQP1, 8, 3 i 11 (Finn i Cerdà 2015a; Soto i in. 2012)

1.2.1. Akwaporyny typu AQP1

Do grupy obejmującej akwaporyny typu AQP1 należą tzw. ortodoksyjne akwaporyny. W przypadku człowieka, są to AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5 i AQP6 (Day i in. 2014). Geny kodujące te białka, podobnie jak wszystkie pozostałe geny akwaporynowe, charakteryzują się tkankowo-specyficzną ekspresją, która może być zawężona tylko do jednej tkanki lub też ulegać ekspresji w wielu tkankach i organach (Li i Wang 2017). Cechą charakterystyczną białek typu AQP1 jest ich powszechne występowanie. Zlokalizowane są w błonach komórek układu wydalniczego, oddechowego, nerwowego, pokarmowego, krwionośnego oraz rozrodczego. Ich wspólną cechą jest szybki transport wody, w porównaniu do akwaporyn z pozostałych grup (Day i in. 2014). Dodatkowo, niektóre posiadają zdolność transportu innych substancji, takich jak dwutlenek węgla, czy nadtlenek wodoru (Herrera i Garvin 2011) (Tab.1). Wyjątek stanowi AQP0, zlokalizowana tylko w komórkach włóknistych soczewki, gdzie odpowiada za tworzenie połączeń międzykomórkowych (Kumari i in. 2013). Wszystkie akwaporyny należące do typu AQP1 zlokalizowane są jedynie w błonie komórkowej i nie tworzą funkcjonalnych kanałów wodnych w błonach przedziałów wewnątrzkomórkowych (Day i in. 2014).

Do tej grupy zalicza się również akwaporyny bezkręgowców, w tym akwaporyny owadów, które dotychczas najlepiej poznano (Benoit i in. 2014). W obrębie typu AQP1 akwaporyny owadów dzielone są na trzy podgrupy: DRIP (ang. *Drosophila* integral protein), PRIP (ang. *Pyrocoelia rufa* integral protein) oraz BIB (ang. Big Brain) (Campbell i in. 2008) (Ryc. 4). Podobnie, jak u człowieka, akwaporyny DRIP i PRIP owadów należące do typu AQP1 mają zdolność do szybkiego transportu wody oraz zlokalizowane są w wielu tkankach i organach (Nagae i in. 2013). Białka należące do grupy BIB, podobnie jak AQP0, nie transportują wody, lecz są odpowiedzialne za adhezję komórek (Tatsumi i in. 2009).

Na podstawie podobieństwa sekwencji, lokalizacji w komórce oraz transportowanych substancji przyjmuje się, że akwaporyny roślinne z grupy PIP są odpowiednikami zwierzęcych białek należących do typu AQP1 (Perez Di Giorgio i in. 2014). Mają one zdolność transportu wody oraz dwutlenku węgla i nadtlenku wodoru (Katsuhara i Hanba 2008), a ich występowanie w roślinach jest bardzo powszechne.

1.2.2. Akwaporyny typu AQP8

Białka należące do typu AQP8, zwane również akwaamoniaporynami, posiadają zdolność transportu nie tylko wody, ale również amoniaku (Finn i Cerda 2015a). U człowieka przedstawicielem tej grupy kanałów wodnych jest tylko białko AQP8

(Molinas i in. 2012). Podobnie, jak akwaporyny typu AQP1, ludzka AQP8 jest szeroko rozpowszechniona i występuje w komórkach układu pokarmowego, oddechowego, wydalniczego oraz rozrodczego (Li i Wang 2017). Co istotne, w przeciwieństwie do akwaporyn z grupy typu AQP1, AQP8 zlokalizowana jest wewnątrzkomórkowo, w błonie wewnętrznej mitochondriów (Calamita i in. 2005). Białka należące do tej grupy posiadają również zdolność transportu nadtlenu wodoru (Tab.1). Dzięki lokalizacji w wewnętrznej błonie mitochondrialnej oraz przepuszczalności dla H_2O_2 , akwaporyny te pełnią bardzo istotną rolę w zachowaniu potencjału błony wewnętrznej oraz w syntezie ATP (Chauvigné i in. 2015).

Przeprowadzone dotychczas badania wskazują, że białka typu AQP8 nie występują powszechnie u bezkręgowców (Finn i in. 2015b). Do tej pory ich obecność została potwierdzona jedynie u nicieni i niesporczaków (Grohme i in. 2013; Huang i in. 2007).

Pierwszą akwaporyną zidentyfikowaną u roślin było białko TIP1;1 z *Arabidopsis thaliana* (Jauh i in. 1998). Zlokalizowane jest ono w tonoplaście, czyli błonie otaczającej wakuolę podobnie, jak wszystkie białka należące do typu TIP. Białka TIP transportują wodę, mocznik oraz amoniak, nie są jednak przepuszczalne dla glicerolu (Maurel i in. 2015). Lokalizacja wewnątrzkomórkowa oraz specyficzność transportu sugerują, że białka TIP są roślinnymi odpowiednikami zwierzęcych akwaporyn typu AQP8 (Perez Di Giorgio i in. 2014).

1.2.3. Akwaporyny typu AQP3

Do białek typu AQP3 należą tzw. akwagliceroporyny (Finn i Cerda 2015a). Jak wskazuje ich nazwa, mają one zdolność transportu wody oraz glicerolu. Ponadto, białka należące do tej grupy mogą również transportować związki metali, zwłaszcza arsenu, kwas borowy oraz mocznik (Finn i Cerda 2015a).

U człowieka do grupy tej należą AQP3, AQP7, AQP9 oraz AQP10 (Li i Wang 2017). Stanowią one drogę pobierania glicerolu w jelitach oraz umożliwiają jego magazynowanie bądź uwalnianie z adipocytów, w zależności od stanu metabolicznego organizmu. Ich obecność w sercu i mięśniach szkieletowych umożliwia wykorzystanie glicerolu jako substratu w reakcjach energetycznych, a w wątrobie umożliwiają transport glicerolu do hepatocytów i wykorzystanie go podczas glukoneogenezy (Laforenza i in. 2016a) (Tab.1). Zatem, jeśli białka typu AQP1 utrzymują homeostazę wodną organizmu, to białka typu AQP3 uczestniczą głównie w akumulacji tłuszczów i w związanych z nimi zmianach metabolicznych (da Silva i Soveral 2017).

Białka należące do typu AQP3 zostały opisane również u bezkręgowców. Zidentyfikowano je u nicieni, niesporczaków oraz stawonogów (Benoit i in. 2014; Grohme i in. 2013; Huang i in. 2007). W przypadku tych ostatnich warto jednak zwrócić uwagę, że wśród owadów holometabolicznych białka te nie zostały dotychczas zidentyfikowane (Finn i in. 2015b) (Ryc. 4).

U roślin natomiast akwaporynami transportującymi wodę i glicerol są białka NIP. Podobnie, jak akwaporyny zwierzęce typu AQP3 dodatkowo mają one zdolność transportu arsenu, kwasu borowego oraz mocznika (Maurel i in. 2015). Tym samym sugeruje się, że białka NIP oraz przedstawiciele typu AQP3 są homologami (Perez Di Giorgio i in. 2014).

1.2.4. Akwaporyny typu AQP11

Białka należące do typu AQP11 nazwane są również akwaporynami nieortodoksyjnymi lub superakwaporynami ze względu na niskie podobieństwo sekwencji do innych akwaporyn (Ishibashi 2006). Ponadto, są to jedyne akwaporyny człowieka, u których występuje zmiana aminokwasu w motywie NPA. Co więcej, ich koniec N jest znacznie krótszy i charakterystyczny dla białek kierowanych do przedziałów wewnątrzkomórkowych (Ishibashi i in. 2014).

Dotychczas uzyskano niewiele danych dotyczących funkcjonowania tych białek oraz transportowanych przez nie substancji. Wiadomo, że ludzka AQP11 ulega ekspresji w siateczce śródplazmatycznej komórek jąder. Potwierdzono, że transportuje ona wodę, natomiast nie udało się zweryfikować możliwości transportu glicerolu. Drugą ludzką akwaporyną należącą do tej grupy jest AQP12. W przypadku tego białka nie udało się dotychczas nawet potwierdzić możliwości transportu wody (Tab. 1). Udowodniono jedynie, że podobnie jak AQP11, zlokalizowana jest ona w błonie siateczki śródplazmatycznej (Ishibashi i in. 2014).

Białka należące do typu AQP11 zlokalizowano również u owadów, przy czym, zmiana motywu NPA w tych białkach jest znacznie częstsza (Fabrick i in. 2014). W ludzkich AQP11 i AQP12 w pierwszym motywie NPA dochodzi tylko do podstawienia alaniny cysteiną, natomiast u owadów motyw NPA zastąpiony jest motywem CPY (cysteina-prolina-tyrozyna). Brak jest jednak informacji, czy białka te transportują wodę (Fabrick i in. 2014).

Białka SIP są roślinnymi odpowiednikami akwaporyn zaliczanych do typu AQP11. Charakteryzują się zmienionym pierwszym motywem NPA oraz lokalizacją wewnątrzkomórkową (Maurel i in. 2015). Podobnie, jak białka typu AQP11,

akwaporyny z grupy SIP wykazują niskie podobieństwo sekwencji do białek z pozostałych grup (Perez Di Giorgio i in. 2014).

Tab. 1. Akwaporyny człowieka – podział, transportowane substancje i lokalizacja

Grupa	Akwaporyna	Transportowane substancje	Lokalizacja
Typ AQP1	AQP0	woda, CO ₂	oko
	AQP1	woda, CO ₂ , NO, H ₂ O ₂ , NH ₃	ukł. pokarmowy, oddechowy, krwionośny, nerwowy, wydaliniczy, mięśniowy, rozrodczy
	AQP2	woda, NO	ukł. wydaliniczy, nerwowy, rozrodczy
	AQP4	woda, CO ₂	ukł. pokarmowy, oddechowy, krwionośny, nerwowy, wydaliniczy, mięśniowy, rozrodczy
	AQP5	woda, CO ₂	ukł. pokarmowy, oddechowy, nerwowy, wydaliniczy, rozrodczy
	AQP6	woda, CO ₂ , NH ₃	ukł. wydaliniczy, nerwowy
Typ AQP8	AQP8	woda, NH ₃ , mocznik, H ₂ O ₂	ukł. pokarmowy, oddechowy, krwionośny, nerwowy, wydaliniczy, mięśniowy, rozrodczy
Typ AQP3	AQP3	woda, glicerol, mocznik	skóra, ukł. wydaliniczy, krwionośny, pokarmowy, oddechowy, mięśniowy
	AQP7	woda, glicerol, mocznik	skóra, tkanka tłuszczowa, ukł. wydaliniczy
	AQP9	woda, glicerol, mocznik	wątroba, ukł. rozrodczy
	AQP10	woda, glicerol, mocznik	ukł. pokarmowy
Typ AQP11	AQP11	woda	ukł. rozrodczy
	AQ12	woda	trzustka

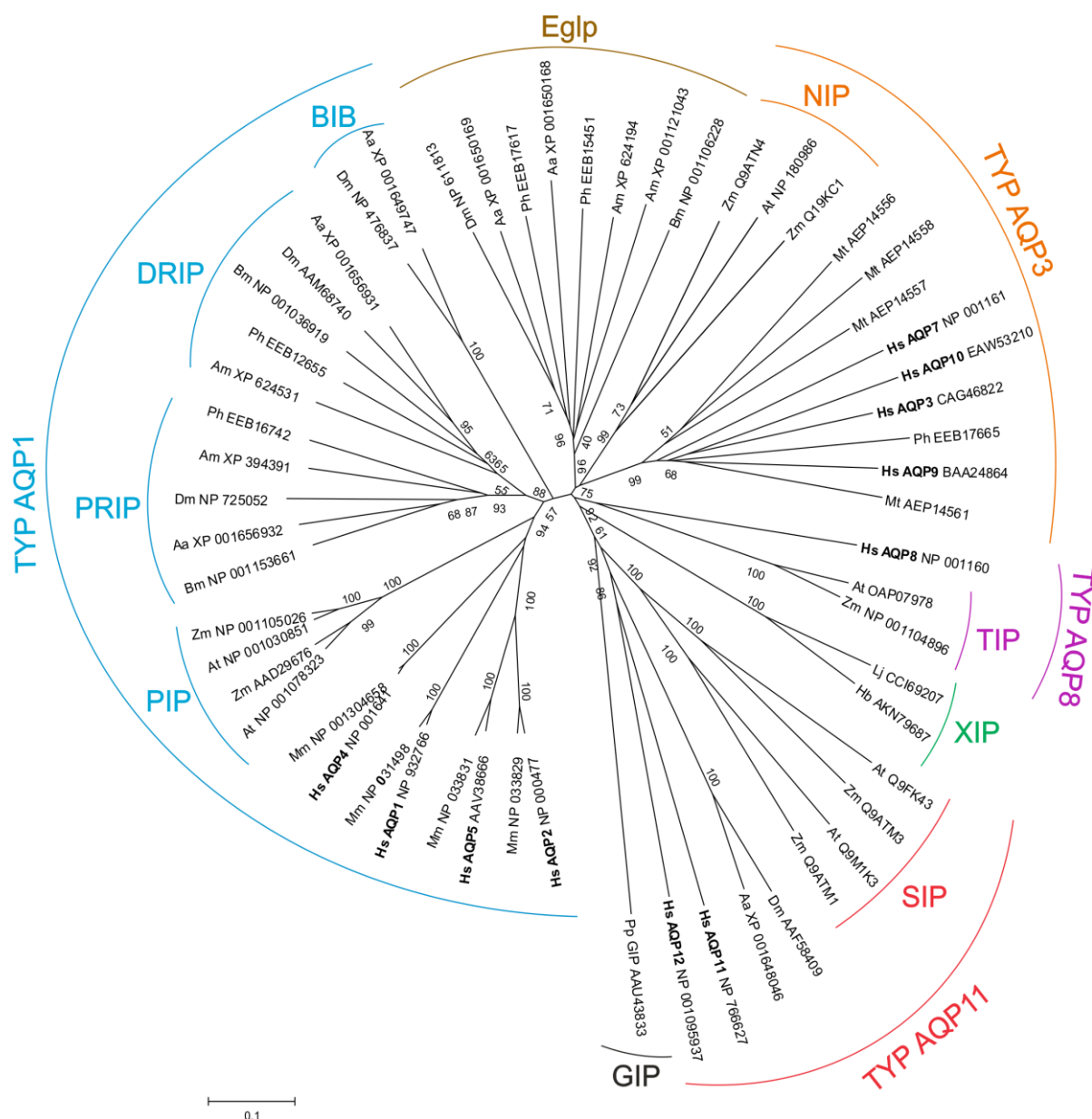
1.2.5. Akwaporyny nieklasyfikujące się do czterech głównych typów

Większość dotychczas zidentyfikowanych akwaporyn można przypisać do jednego z czterech zwierzęcych typów akwaporyn: AQP1, AQP8, AQP3 oraz AQP11 (Abascal i in. 2014). Warto jednak zwrócić uwagę, że nie wszystkie wpisują się w ten schemat podziału. Jednym z przykładów są entomogliceroporyny (Eglp) czyli białka

występujące u Endopterygota - owadów uskrzydłonych (Finn i in. 2015b). Cechą charakterystyczną tych białek jest możliwość transportu wody oraz glicerolu, jednakże filtr selektywności odbiega strukturą od flitów białek należących do typu AQP3, a bardziej przypomina filtr białek należących do typu AQP1. Co ciekawe, wykazano, że zmiana dwóch aminokwasów w regionie ar/R wystarczy, żeby białko typu AQP1 mogło transportować glicerol (Beitz i in. 2006). Stąd przypuszczenie, że geny kodujące białka Eglp ewolucyjnie pochodzą od białek należących do typu AQP1, a nie AQP3 (Finn i in. 2015b) (Ryc. 4).

Kolejną grupą charakterystyczną tylko dla jednego taksonu, tworzącą osobną gałąź na drzewie filogenetycznym jest tzw. grupa specyficzna dla roztoczy (Benoit i in. 2014). Do tej pory nie przeprowadzono badań wskazujących, jakie substancje transportują te białka. Filtr selektywności oraz umiejscowienie na drzewie filogenetycznym wskazują na możliwość transportu glicerolu, jednak to przypuszczenie, jak również określenie czy białka te występują tylko u roztoczy czy też u całej grupy pajęczaków wymagają dalszych badań.

Wśród roślin również występują akwaporyny, które nie mają obecnie wyznaczonych odpowiedników wśród zwierzęcych akwaporyn (Bienert in. 2011). Grupy NIP, TIP, PIP i SIP są odpowiednikami typów AQP1, AQP3, AQP8 i AQP11, natomiast akwaporyny identyfikowane u roślin niższych, należące do XIP, HIP i GIP tworzą swoje własne, odrębne grupy (Perez Di Giorgio i in. 2014). Być może, homologów akwaporyn należących do tych ostatnich grup należy szukać wśród akwaporyn bezkręgowców, które również nie wykazują podobieństwa do żadnego z czterech typów AQP.



Ryc. 4. Analiza filogenetyczna białek należących do rodziny MIP. Drzewo zbudowane metodą Neighbor-Joining na podstawie sekwencji zdeponowanych w GenBanku (Aa - *Aedes aegypti*; Am - *Apis mellifera*; At - *Arabidopsis thaliana*; Bm - *Bombyx mori*; Dm - *Drosophila melanogaster*; Hb - *Herea brasiliensis*; Hs - *Homo sapiens*; Li - *Lotus japonicus*; Mm - *Mus musculus*; Mt - *Milnesium tardigradum*; Ph - *Pediculus humanus*; Pp - *Physcomitrella patens*; Zm - *Zea mays*)

1.5. Akwaporyny mięczaków

Wiedza dotycząca akwaporyn mięczaków jest bardzo uboga. Dotychczas opublikowano tylko kilka artykułów dotyczących kanałów wodnych u tej grupy zwierząt (Colgan i Santos 2018; Meng i in. 2013; Pieńkowska i in. 2014). Jest to zaskakujące, ponieważ Typ Mollusca obejmuje ok 130 tys. gatunków żyjących w najróżniejszych

środkowiskach (Błaszak 2009), a co za tym idzie, mogących znacząco różnić się repertuarem akwaporyn. W bazie danych Protein Database, będącej elementem National Center for Biotechnology Information (NCBI), do tej pory zamieszczono sekwencje aminokwasowe tylko 18 akwaporyn mięczaków. Większość sekwencji dotyczy mięczaków wodnych, przy czym funkcjonalność tych białek potwierdzono tylko dla trzech sekwencji otrzymanych dla błotniarek *Lymnaea stagnalis*, *Ladislavella terebra* oraz *Stagnicola palustris* (Pieńkowska i in. 2014). Akwaporyny te należą do typu AQP1. Potwierdzono, że transportują one wodę, brak jest natomiast informacji na temat możliwości transportu nadtlenu wodoru, czy dwutlenku węgla. Podobnie, jak inne białka typu AQP1, akwaporyny te charakteryzują się powszechnością występowania i zlokalizowane są w komórkach zwojów mózgowych, nerki, stopy, układu rozrodczego i pokarmowego.

Projekty sekwencjonowania genomu dotyczą obecnie 10 gatunków mięczaków: ośmiornicy *Octopus bimaculoides*, małży morskich *Mytilus galloprovincialis* i *Crassostrea gigas*, małży słodkowodnych *Corbicula fluminea* i *Dreissena polymorpha*, ślimaków morskich *Lottia gigantea*, *Conus tribblei* i *Aplysia californica* oraz ślimaków słodkowodnych *L. stagnalis* i *Biomphalaria glabrata*. Przeszukiwanie baz danych opartych na tych projektach pozwala odszukać więcej sekwencji kodujących domniemane akwaporyny. Podobnie, jak w przypadku innych bezkręgowców, u tych zwierząt występują akwaporyny, które należą do każdego z czterech typów akwaporyn (typ AQP1, AQP8, AQP3 oraz AQP11) oraz takie, które nie grupują się z żadną z nich na drzewie filogenetycznym. Nie ma jednak żadnych informacji dotyczących ich funkcjonalności i specyficzności transportowej.

1.6. Akwaporyny jako element odpowiedzi na stres środowiskowy

Warunki klimatyczne są czynnikami środowiska, które najsilniej wpływają na systemy biologiczne. Czynnikami wywierającymi największy wpływ są temperatura oraz dostęp do wody (Schmidt-Nielsen 2008). Istotne zmiany w zakresie tych dwóch czynników mogą prowadzić do powstania warunków stresu. Oba te typy czynników stresowych ściśle wiążą się z problemem utrzymania homeostazy wodnej organizmu czyli między innymi przeciwdziałaniem tworzeniu się w obrębie komórek kryształów lodu i utracie wody (Schmidt-Nielsen 2008). W obu przypadkach transport wody, wynikający z funkcjonowania akwaporyn, ma więc prawdopodobnie istotne znaczenie. Ich udział w adaptacji do warunków stresu został potwierdzony dla kilku gatunków owadów: *Eurosta solidaginis* (Philip i in. 2011; Philip i Lee 2010), *Belgica antarctica* (Goto i in. 2011 i 2015) oraz *Polypedilum vanderplanki* (Kikawada i in. 2008).

E. solidaginis jest owadem należącym do rzędu błonkoskrzydłych występującym w strefie umiarkowanej półkuli północnej na terenach, gdzie temperatura w czasie zimy może spadać do -40°C (Philip i Lee 2010). Tym samym owady te muszą posiadać mechanizmy chroniące je przed zamarzaniem. Jednym z podstawowych rozwiązań jest akumulacja glicerolu w okresie poprzedzającym mrozy. W momencie pojawienia się zimna i wywołanych nim zmian w tkankach, dochodzi do szybkiej redystrybucji glicerolu oraz wody. Polega ona na usunięciu wody z komórek oraz transporcie do nich glicerolu, pełniącego rolę krioprotektanta. Ponieważ oba te związki mogą być transportowane przez akwaporyny, białka te odgrywają podstawową rolę w ochronie organizmu przed zimnem. Wykazano, że w warunkach stresu zimna co najmniej dwukrotnie wzrasta zawartość akwaporyny EsAQP1 w błonie komórkowej we wszystkich badanych tkankach, a zastosowanie inhibitora tych białek (Hg^{2+}) uniemożliwiło osobnikom *E. solidaginis* przeżycie w tych warunkach. Tym samym potwierdzono istotną rolę, jaką pełnią akwaporyny w adaptacji do stresu zimna (Philip i in. 2011; Philip i Lee 2010).

B. antarctica to gatunek muchówki żyjący na Antarktydzie. W przeciwieństwie do *E. solidaginis* giną one w temperaturze poniżej -15°C , potrafi jednak przetrwać długie miesiące w temperaturze oscylującej wokół -5°C (Goto i in. 2011). Również w przypadku tej muchówki akwaporyny biorą udział w przeciwdziałaniu skutkom działania niskiej temperatury. Badania poziomu ekspresji genów czterech akwaporyn w trakcie działania stresu zimna wykazały, że dwa ulegają wyższej ekspresji, a dwa niższej w porównaniu do warunków kontrolnych. Wyniki te wskazują, że prawdopodobnie dwie akwaporyny są odpowiedzialne za utrzymanie homeostazy w warunkach optymalnych, a dwie za kontrolowanie transportu wody i krioprotektantów w warunkach stresu (Goto i in. 2011 i 2015).

Podobną zależność zaobserwowano u *P. vanderplanki*. Owad ten występuje w Afryce na obszarach półpustynnych i w trakcie suszy zapada w stan anhydrobiozy. Dotychczas zidentyfikowano u niego dwie akwaporyny. Gen kodujący jedną z nich ulega zwiększonej ekspresji w trakcie anhydrobiozy, natomiast drugi wykazuje znacząco niższy poziom ekspresji w porównaniu do warunków optymalnych (Kikawada i in. 2008).

Podsumowując, akwaporyny regulują gospodarkę wodną w trakcie działania stresu spowodowanego zarówno niską, jak i wysoką temperaturą. Stres związany z brakiem wody uruchamiać może także zjawisko estywacji, czyli występujący w okresie letnim stan spowolnienia procesów fizjologicznych spowodowany wpływem warunków środowiska, głównie suszy. Ta strategia przetrwania niekorzystnych

warunków występuje zarówno u bezkręgowców, jak i kręgowców, przy czym została najlepiej przebadana u ślimaków, ryb dwudysznych i płazów.

1.7. Estywacja jako złożona strategia obrony przed stresem środowiskowym

Estywacja charakteryzuje się spowolnieniem metabolizmu, które jest możliwe dzięki zmianom zachodzącym zarówno na poziomie behawioralnym, jak i fizjologiczno-biochemicznym (Storey 2002). Odnalezienie odpowiedniego miejsca schronienia pozwala na ograniczenie utraty wody. Przygotowujące się do estywacji żaby, kryją się w norach i kulą się z kończynami ukrytymi pod ciałem w celu zmniejszenia powierzchni parowania. Ryby dwudyszne zakopują się w mule i wytwarzają powłokę śluzową pokrywającą ciało (Chng i in. 2016). Ślimaki natomiast, wyszukują miejsca, w których niekorzystne warunki są najmniej odczuwalne i chowając się do muszli, zmniejszają parowanie z powierzchni ciała (Cameron 2016).

Utrzymanie odpowiedniego uwodnienia ciała jest możliwe również dzięki zmianom zachodzącym na poziomie fizjologiczno-biochemicznym (Storey 2002). Płazy magazynują w pęcherzu moczowym duże ilości wody, która jest wykorzystywana w trakcie estywacji (Suzuki i Tanaka 2009). Ślimaki nie magazynują wody, ale ograniczają jej utratę za pomocą innych mechanizmów. Ograniczają wentylowanie worków płucnych do 2-3 razy na godzinę, co zmniejsza parowanie oraz zamykają wejście do muszli za pomocą epifragmy (Rizzatti i Romero 2001; Storey i Storey 1990).

W trakcie estywacji zwierzęta nie pobierają pokarmu, co wyklucza ten sposób uzupełniania potrzeb energetycznych i wymusza spowolnienie tempa metabolizmu. Związane jest z nim ograniczenie syntezy ATP. Odpowiednie wykorzystanie zmniejszonej ilości ATP to, po zabezpieczeniu się przed utratą wody, drugi element istotny dla przetrwania w stanie estywacji. Największe ilości ATP pochłania synteza białek (Pakay i in. 2002). Tym samym, jej ograniczenie jest podstawowym mechanizmem zmniejszającym wykorzystanie ATP. U ślimaka szarego *Helix aspersa* w trakcie estywacji synteza białka zostaje obniżona w wątrobotrzustce o ponad 70%, a w nodze o blisko 50% (Pakay i in. 2002). Jednak pomimo ogólnego obniżenia poziomu syntezy białek, część z nich ulega zwiększonej syntezie w trakcie estywacji (Storey 2002). Są to głównie białka o działaniu antyoksydacyjnym, związane z metabolizmem cukrów, które stanowią podstawowe źródło energii w trakcie estywacji, oraz z metabolizmem tłuszczu, które stają się jej źródłem w trakcie przedłużającego się stanu spoczynku (Nowakowska i in. 2009 i 2011; Sun i in. 2013). Dodatkowo, zwiększa się poziom białek szoku termicznego (Hsp, z ang. Heat Shock

Protein), czyli białek opiekuńczych odpowiedzialnych za ochronę i zapewnienie utrzymania prawidłowej konformacji innych białek (Mizrahi i in. 2015). Ponadto, zwiększa się poziom białek, które biorą udział w powstawaniu mocznika oraz kwasu moczowego (Bell i in. 2012). U estywujących zwierząt wykazano również, że zwiększone stężenie mocznika wspomaga utrzymanie wody wewnątrz komórek (Bell i in. 2012).

Opierając się na danych literaturowych stwierdzić można, że akwaporyny są istotnym elementem przeciwdziałającym skutkom działania różnych stresów środowiskowych (Cerdea i in. 2017; Foguesatto i in. 2017; Sabir i in. 2017; Valdez i in. 2006). Prawdopodobnie więc, w przypadku estywacji białka te pełnią również istotną rolę, gdyż zachowanie homeostazy wodnej jest, obok zmniejszenia zapotrzebowania energetycznego, procesem krytycznym dla przeżycia w tym okresie. Zaskakujące jest więc, że jedyne dostępne obecnie informacje na temat funkcjonowania akwaporyn w trakcie estywacji dotyczą tylko dwóch gatunków zwierząt - traszki *Triturus italicus* oraz ryby dwudysznej *Protopterus annectens* (Brunelli i in. 2007; Chng i in. 2016 i Suzuki i Tanaka 2009). U *T. italicus* przebadano tylko jedną akwaporynę, AQP3, której zawartość na poziomie białka zwiększa się w trakcie estywacji (Brunelli i in. 2007).

W przypadku ryby *P. annectens* sprawdzono, jak zmienia się poziom ekspresji genów oraz ilość białka Aqp1 oraz Aqp3 w skrzelach. W obu przypadkach dochodziło do spadku ilości zarówno na poziomie mRNA, jak i białka. Prawdopodobnie jest to związane z unieczynnieniem skrzeli w trakcie estywacji. Ilość mRNA oraz białka Aqp3 wraca do poziomu wyjściowego już na trzeci dzień po zakończonej estywacji.

Warto również zwrócić uwagę, że większość badań dotyczących zmian, jakie zachodzą w trakcie estywacji na poziomie fizjologiczno-biochemicznym, dotyczy ślimaków, które już zapadły w stan odrętwienia (Mizrahi i in. 2015; Nicolai i in. 2011; Ramnanan i Storey 2006). Brak jest natomiast informacji, co się dzieje w okresie pomiędzy pełną aktywnością, a estywacją. Nie wiadomo, w którym momencie spada poziom syntezy białek, czy zmiany te następują stopniowo, czy gwałtownie. Brak jest również informacji, czy obniżenie bądź wzrost syntezy danego białka jest utrzymywany przez cały czas zapadania ślimaków w stan estywacji, czy też ulega zmianom.

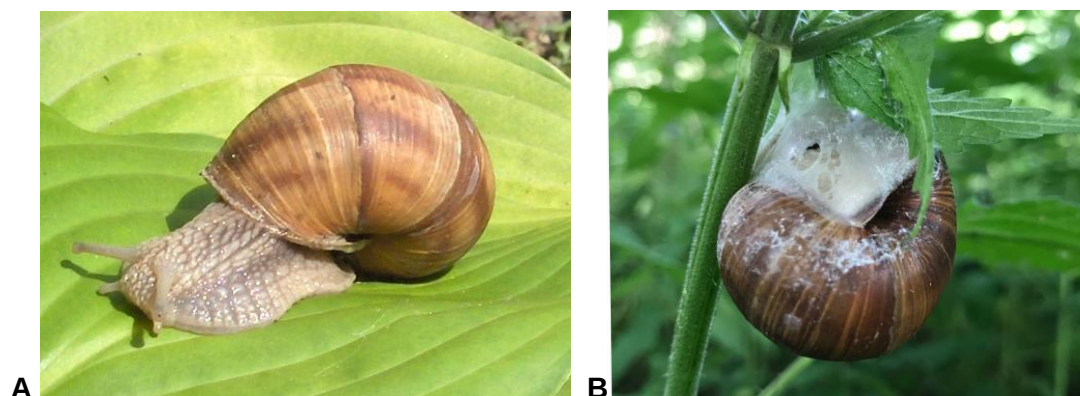
1.8. Obiekt badań: ślimak winniczek *Helix pomatia* L.

Ślimak winniczek *Helix pomatia* L. (Typ: Mollusca, Gromada: Gastropoda, Podgromada: Pulmonata, Rząd: Stylommatophora, Rodzina: Helicidae) występuje powszechnie na terenie całej Polski. Pierwotnie występował w jej południowej części,

ale w wyniku działalności człowieka rozprzestrzenił się na cały kraj. Zamieszkuje tereny o odpowiednio wysokiej wilgotności takie, jak lasy, parki, ogrody, ale również otwarte tereny zwłaszcza w pobliżu rzek (Welter-Schultes 2012; Wiktor 2004). Dodatkowo, czynnikiem wpływającym na jego występowanie jest obecność wapnia w glebie i ściółce, gdyż pierwiastek ten jest niezbędny do budowy muszli oraz do rozrodu (Błaszak 2009). Zasięg jego występowania obejmuje centralną oraz południowo-wschodnią Europę do wysokości 2000 n.p.m. (Welter-Schultes 2012).

Klimat umiarkowany występujący na obszarze zajmowanym przez ślimaka winniczka powoduje, że prowadzi on aktywny tryb życia tylko w okresie wegetacyjnym. Okres jesienno-zimowy spędza w uśpieniu, zagrzebany w ściółce lub w glebie. W pozostałym okresie wykazuje aktywność zależną od warunków wilgotności. Największą aktywność wykazuje w godzinach wczesno porannych, gdy wilgotność względna wynosi 100%. W niesprzyjających warunkach trwa w bezruchu z ciałem wciągniętym do muszli. Stan ten może trwać przez kilkanaście godzin (aktywność dobową) lub nawet kilka tygodni (estywacja) (Stępczak i Bogucki 1983).

Ślimak winniczek *Helix pomatia* L. został wybrany do badań jako reprezentant grupy ślimaków lądowych. Wybór podyktowany był z jednej strony jego liczebnością, co przekłada się na dużą dostępność materiału, jak i rozmiarami ślimaka, które ułatwiały izolację poszczególnych organów. Ponadto, ślimak ten obok *L. stagnalis* oraz *B. glabrata* traktowany jest jako model w badaniach fizjologicznych tej grupy zwierząt (Błaszak 2009).



Ryc. 5. Ślimak winniczek *Helix pomatia* L. (A) ślimak aktywny; (B) ślimak estywujący.
Fot. E. Kosicka

2. CEL PRACY

Celem pracy była identyfikacja sekwencji nukleotydowych kodujących akwaporyny u ślimaka *Helix pomatia* oraz charakterystyka bioinformatyczna oraz funkcjonalna białek przez nie kodowanych. Akwaporyny to białka budujące kanały wodne, które są istotne dla prawidłowego funkcjonowania organizmu nie tylko w warunkach fizjologicznych, ale również podczas działania stresów środowiskowych. Z tego względu sprawdzono również, czy akwaporyny biorą udział w regulacji homeostazy wodnej organizmu w trakcie zapadania ślimaka w stan estywacji. Cel pracy osiągnięto realizując trzy zadania badawcze:

1. Identyfikacja sekwencji nukleotydowych kodujących akwaporyny ślimaka *H. pomatia* oraz analiza bioinformatyczna sekwencji aminokwasowych tych białek otrzymanych w wyniku translacji *in silico*.
2. Potwierdzenie funkcjonalności białek kodowanych przez zidentyfikowane sekwencje nukleotydowe za pomocą testu komplementacji w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae*.
3. Określenie zmian w poziomie ekspresji genów akwaporyn w trakcie zapadania ślimaka w stan estywacji.

3. MATERIAŁY

3.1. Materiał biologiczny

3.1.1. Ślimak winniczek *Helix pomatia* L.

Ślimaki winniczki odłowiono w okolicach Poznania w maju, zgodnie z pozwoleniem nr WPN-II.6401.90.2013 EH wydanym przez Regionalnego Dyrektora Ochrony Środowiska. Następnie hodowano je w szklanym terrarium na podłożu z ziemi ogrodniczej wymieszanej z torfem, karmiono pokarmem roślinnym dwa razy w tygodniu i zraszano wodą.

W celu wprowadzenia ślimaków w stan estywacji, zwierzęta przełożono do szklanego terrarium z podłożem z ziemi ogrodniczej i zaprzestano podawania pokarmu oraz zraszania. Ślimaki podzielono na cztery grupy, z których każda trzymana była w terrarium w tych warunkach przez odpowiednio 3, 7, 15 i 35 dni.

3.1.2. Bakterie *Escherichia coli*

W badaniach stosowano szczep bakterii One Shot® TOP10 Chemically Competent (*Thermo scientific*) o genotypie F-*mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80/*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara**leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (StrR) *endA1* *nupG*.

3.1.3. Drożdże *Saccharomyces cerevisiae*

W eksperymentach stosowano mutant szczepu *Saccharomyces cerevisiae* YLL043w (BY4741; *MAT a*; *his3* Δ 1; *leu2* Δ 0; *met15* Δ 0; *ura3* Δ 0; YLL043w::kanMX4), oznaczony symbolem Δ *fps1*. Mutant ten pozbawiony jest genu *fps1* kodującego akwagliceroporynę oraz posiada niefunkcjonalne akwaporyny ortodoksyjne.

3.2. Zestawy odczynników

Zestaw do izolacji RNA – Universal RNA Purification Kit – *EURx*

Zestaw do klonowania – TOPO® PCR Cloning – *Thermo Scientific*

Zestaw do Real-Time PCR - Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR – *Thermo Scientific*

Zestaw do izolacji plazmidowego DNA – Presto™ Midi Plasmid Kit – *Geneaid*

Zestaw do oczyszczania DNA – Spin Column DNA Cleanup Mini-preps Kit – *Bio Basic*

Zestaw do oczyszczania DNA z żelu agarozowego – EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit – *Bio Basic*

Zestaw do oznaczania stężenia glicerolu – Glycerol assay kit – *Sigma*

3.3. Enzymy

DNase I [1U/μl] – *EURx*

AMV Reverse Transcriptase Native [5U/μl] – *EURx*

Ribonuclease Inhibitor [30U/μl] – *EURx*

Terminal Deoxynucleotidyl Transferase [30U/μl] – *Promega*

GoTaqG2 DNA Polymerase [5U/μl] – *Promega*

FastDigest EcoRI [1U/μl] – *Thermo Scientific*

FastDigest EcoRV [1U/μl] – *Thermo Scientific*

FastDigest MluI [1U/μl] – *Thermo Scientific*

T4 DNA Ligase [268U/μl] – *EURx*

3.4. Startery

Startery projektowano przy pomocy programu Primer-BLAST dostępnego na stronie internetowej <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (Ye i in. 2012). We wszystkich opisach „f” oznacza starter wiodący (ang. forward), a „r” starter odwrotny (ang. reverse).

3.4.1. Startery do reakcji 5' i 3' RACE

5'RACE

HpAQP1	r1 5' TAAATGGAACAGCAAACAGGTG 3'
	r2 5' ATGCCGTCTGGAATATCGTTAG 3'

5'RACE

HpAQP2	r1 5' AGCGAAAATGTATTCATACAGGA 3'
	r2 5' AGAACGCCCCTGATAATACTGA 3'
	r3 5' GTGAGGCCAAAAGTCAGAGC 3'

5'RACE

HpAQP4	r1 5' CAAGGAACCTAGTATTGACC 3'
	r2 5' CATGCACTTTGCGTGAAGAC 3'

3'RACE

HpAQP1	f1 5' AGGATTTGGAGTGGAGCTGATA 3'
	f2 5' GAATCCTCTACGGTCTCACTCCTA 3'

5' RACE

Vial 8 ¹	f1 5'GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTT 3'
Vial 9 ¹	f2 5'GACCACGCGTATCGATGTCGAC 3'

3' RACE

QO	r 5'CCAGTGAGCAGAGTGACG 3'
QI	r2 5'GAGGACTCGAGCTCAAGC 3'

3.4.2. Startery do reakcji Real-Time PCR

HpAQP1	f 5' AGGATTTGGAGTGGAGCTGATA 3' r 5' TAAATGGAACAGCAAACAGGTG 3'
HpAQP2	f 5' TCAGTATTATCAGGGGCGTTCT 3' r 5' GGCTCCTAGGTTTTGCTGAGTA 3'
HpAQP3	f 5' CACTGGATCTACTGGCTTGC 3' r 5' GGTGTTAAGTTCCGTGTTGG 3'
HpAQP4	f 5' GCCACCAGTACGTGTTTCCT 3' r 5' CATGCACTTTGCGTGAAGAC 3'
HpAQP5	f 5' GCAACAAACGAATCTTCAGACA 3' r 5' CTGGGTAAATGTGACCTCCACT 3'
HpAQP6	f 5' CTTTGGTTGATCCAGGTCGT 3' r 5' AGGATTCATGGAAGCACCAG 3'
EF1	f 5' GCAGGATGTCTACAAAATTGG 3' r 5' TTGACCTCAGTGGTGACGTTAG 3'

3.4.3. Startery do przygotowania konstruktów

HpAQP1	f 5' CGACGCGTAAATGTTTGGTATCATG 3' r 5' CGCGATATCATGATGGTGATGGTGATGTTTCTCCTGCTCATTT 3'
HpAQP2	f 5' CGACGCGTAAATGCATAAGATCATGGAGGAG 3' r 5' CGCGATATCATGATGGTGATGGTGATGCTTGAATCGTC 3'
HpAQP3	f 5' CGACGCGTAAATGGTCTCATGCACAGAACTT 3' r 5' GCGATATCATGATGGTGATGGTGATGCAGCCCCTCGCTAGTCGA CGC 3'
HpAQP4	f 5' CGACGCGTATGATTGACATTTTGGGATTTTAC 3' r 5' GCGATATCATGATGGTGATGGTGATGCGAAGAACTAAGTCCAT AGC 3'

¹ Startery Vial 8 i Vial 9 pochodziły z 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation (Roche)

	f 5' CGACGCGTAAAATGGAAGCCCTCTTCATTCAT 3'
HpAQP5	r 5' GCGATATCATGATGGTGATGGTGATGTTCAACGGTCTTCAGTGTA AT 3'
HpAQP6	f 5' CGGAATTCAAAATGTCTGTGGCATCCATCCC 3' r 5' GCGATATCATGATGGTGATGGTGATGAATCTTGCTTTCTGGGGCATG 3'

3.4.4. Inne startery wykorzystywane w badaniach

QT	r 5' CAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGCTTTTTTTT TTTTTTTTT-3'
M13	f 5'-CCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3' r 5'-TCACACAGGAAACAGCTATGAC-3'

3.5. Bufory

TAE 50x stężony (Bufor do elektroforezy agarozowej)

40 mM Tris/HCl

20 mM kwas octowy

0,5 mM EDTA

Dodatkowo stosowano również bufory wchodzące w skład zestawów odczynników podanych w rozdziale 3.2. Zestawy odczynników.

3.6. Plazmidy

Wektor pYX142 (*Novagen*) zawierający gen *LEU* jako marker selekcyjny.

Wektor TOPO (*Thermo Scientific*)

3.7. Pożywki

3.7.1. Pożywki do hodowli bakterii

a) *pożywka LB stała*

20 g/L LB Broth – *BioShop*

100 µg/mL Ampicylina – *BioShop*

1,5% agar – *BioShop*

b) *pożywka LB płynna*

20 g/L LB Broth – *BioShop*

3.7.2. Pożywki do hodowli drożdży

a) YPD stała

2% Baktopen – *BioShop*

1% Ekstrakt drożdżowy – *BioShop*

2% Glukoza – *BioShop*

2% Agar – *BioShop*

b) YPD płynna

2% Baktopen – *BioShop*

1% Ekstrakt drożdżowy – *BioShop*

2% Glukoza – *BioShop*

c) Hipoosmotyczna selekcyjna (YNB – sorbitol) stała

0,67% - NitrogenBase – *Difco*

2% Glukoza – *BioShop*

20 mg/L Metionina – *BioShop*

20 mg/L Histydyna – *BioShop*

20 mg/L Uracyl – *BioShop*

2% Agar – *BioShop*

d) Hipoosmotyczna selekcyjna (YNB – sorbitol) płynna

0,67% - NitrogenBase – *Difco*

2% Glukoza – *BioShop*

20 mg/L Metionina – *BioShop*

20 mg/L Histydyna – *BioShop*

20 mg/L Uracyl – *BioShop*

e) Izoosmotyczna selekcyjna (YNB) stała

0,67% - NitrogenBase – *Difco*

2% Glukoza – *BioShop*

20 mg/L Metionina – *BioShop*

20 mg/L Histydyna – *BioShop*

20 mg/L Uracyl – *BioShop*

1 M Sorbitol – *BioShop*

2% Agar – *BioShop*

f) Izoosmotyczna selekcyjna (YNB) płynna

0,67% NitrogenBase – *Difco*

2% Glukoza – *BioShop*
20 mg/L Metionina – *BioShop*
20 mg/L Histydyna – *BioShop*
20 mg/L Uracyl – *BioShop*
1 M Sorbitol – *BioShop*

3.8. Pozostałe odczynniki

Agaroza – *Genoplast*
IPTG – *BioShop*
X-gal – *BioShop*
GelRed – *Bio Rad*
TRI-REAGENT® – *BioShop*
Chloroform – *POCH Gliwice*
Izopropanol – *POCH Gliwice*
Etanol – *POCH Gliwice*
Fenol kwaśny pH=4,3 ± 0,2 – *Sigma*
Alkohol izoamylowy – *POCH Gliwice*
Perfect 100bp DNA Ladder – *EURx*
RNAlater – *Sigma*
dNTP – *EURx*
dATP – *Novazym*

4. METODY

4.1. Izolacja narządów

W celu izolacji narządów ślimaka, zwierzę umieszczano na 2 godziny w zamkniętym pojemniku wypełnionym wodą. W tym czasie nie miało ono dostępu do tlenu, co skutkowało jego znieczuleniem w wyniku odurzenia przez dwutlenek węgla. Następnie wycinano ze ślimaka poszczególne organy: płaszcz, gruczoł obojnaczy, ślinianki, żołądek, jelito tylne, wątrobotrzustkę, zwoje mózgowe, płuco, nerkę oraz nogę i umieszczano w probówkach zawierających 1 ml RNAlater™. Odczynnik ten chroni RNA przed degradacją umożliwiając długotrwale przechowywanie materiału w celu późniejszej izolacji tego kwasu. Pozostałości ciała ślimaka konserwowano w 75% etanolu.

4.2. Izolacja RNA

4.2.1. Izolacja RNA z wykorzystaniem odczynnika TriReagent

Metodę tę stosowano tylko w przypadku izolacji totalnego RNA z nogi i nerki potrzebnego do sekwencjonowania transkryptomu. Do izolacji wykorzystywano 25 mg materiału, homogenizowanego w 1 ml TriReagentu (Chomczynski 1993) za pomocą szklanego homogenizatora. Następnie próbę inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej, po czym wirowano przez 10 minut przy 12 000x g w temperaturze 4°C w celu usunięcia niezłizowanych fragmentów komórek. Supernatant przenoszono do nowej probówki, dodawano 200 µl chloroformu, wortexowano przez 30 sekund i inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie wirowano przez 15 minut przy 12 000x g w temperaturze 4°C. Fazę wodną (górną) przenoszono do nowej probówki i dodawano 250 µl roztworu zawierającego 1,2 M cytrynian sodu i 0,8 M NaCl. Następnie, w celu wytrącenia RNA, do uzyskanej mieszaniny podawano 250 µl izopropanolu. Całość inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej a następnie wirowano przez 10 minut przy 12 000x g w temperaturze 4°C. Otrzymany osad dwukrotnie przemywano 75% etanolem, a następnie rozpuszczano w 25 µl wody wolnej od enzymów trawiących RNA i poddano trawieniu DNazą.

Do przeprowadzenia reakcji DNazowania stosowano enzym DNase I. Reakcję przeprowadzano w objętości 20 µl. Do probówek podawano:

RNA (2 µg) - 16 µl

10x reaction Buffer - 2 μ l

DNase I - 2 μ l

Mieszano przez pipetowanie, po czym inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37°C. Następnie, w celu inaktywacji enzymu, dodano 2 μ l 25 mM EDTA i inkubowano przez 10 minut w temperaturze 65°C.

RNA wyizolowane z nogi i nerki ślimaka *H. pomatia* zostały połączone i wysłane do firmy BGI sekwencjonującej transkryptomy.

4.2.2. Izolacja RNA z wykorzystaniem kolumnienek

Do izolacji RNA wykorzystywano 20 mg materiału. Przeprowadzano ją na kolumnienkach za pomocą zestawu Universal RNA Purification Kit według protokołu z modyfikacją dotyczącą użycia mieszaniny kwaśny fenol : chloroform : alkohol izoamylowy w stosunku 125:24:1. Zmiana ta była konieczna ze względu na dużą ilość śluzu w tkankach, który uniemożliwiał izolację za pomocą metody standardowej. Do 500 μ l buforu homogenizacyjnego zawierającego roztartą tkankę dodawano 500 μ l mieszaniny kwaśny fenol:chloroform:alkohol izoamylowy (125:24:1), wortexowano przez 1 minutę, a następnie wirowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej przy 14000x g. Otrzymaną fazę wodną (górną) wykorzystywano do dalszej procedury przebiegającej wg protokołu. Elucję RNA wykonywano za pomocą 40 μ l wody wolnej od enzymów trawiących RNA.

Pomiar stężenia otrzymanego RNA wykonywano metodą spektrofotometryczną przy użyciu NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000 (*Thermo Fisher Scientific*) przy długości fali 260 nm w odniesieniu do fali o długości 280 nm. Określono również czystość otrzymanego RNA na podstawie współczynnika A_{260}/A_{280} oraz A_{260}/A_{230} , które określają odpowiednio stopień zanieczyszczenia białkami oraz rozpuszczalnikami organicznymi.

4.3. Odwrotna transkrypcja

Do przeprowadzenia reakcji stosowano odwrotną transkryptazę AMV Reverse Transcriptase Native. Reakcję przeprowadzano w objętości 20 μ l. W pierwszym etapie do probówek podawano:

RNA (1 μ g) - 11 μ l

10 mM dNTP - 2 μ l

10 μ M starter QT - 1 μ l

Mieszano przez pipetowanie, a następnie inkubowano przez 5 minut w temperaturze 65°C w celu denaturacji RNA. Po tym czasie przenoszono na lód, inkubowano przez 5 minut, a następnie dodawano:

5x Reaction Buffer	- 4 µl
0,1 M DTT	- 1 µl
Ribonuclease Inhibitor	- 0,5 µl
AMV Reverse Transcriptase Native	- 0,5 µl

Całość ponownie mieszano przez pipetowanie a następnie inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 50°C. Po zakończonej inkubacji otrzymane cDNA rozcieńczano pięciokrotnie dodając 80 µl wody i stosowano, jako matrycę do reakcji PCR oraz Real-Time PCR.

4.4. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)

4.4.1. Standardowa amplifikacja DNA

W celu określenia, w których narządach ulegają ekspresji geny kodujące akwaporyny, wyizolowano RNA z następujących organów: płaszcza, nogi, ślinianek, żołądka, jelita tylnego, wątrobotrzustki, zwojów mózgowych, płuca, nerki oraz gruczołu obojnaczego. Następnie przepisano go na cDNA, który użyto jako matrycę w reakcjach PCR, ze starterami przedstawionymi w punkcie 3.4.2, prowadzonych zgodnie z następującym profilem termicznym:

Denaturacja wstępna	94°C	2 minuty	} 40 cykli
Denaturacja	94°C	30 sekund	
Przyłączanie starterów	55°C	30 sekund	
Elongacja	72°C	30 sekund	
Elongacja końcowa	72°C	7 minut	

W dalszej części pracy profile termiczne prezentowane będą wg następującego zapisu: 94°C-2'// 94°C-30''/ 55°C-30''/ 72°C-30''// 40 cykli/ 72°C-7'.

4.4.2. Metoda szybkiego powielenia końców cDNA (Rapid Amplification of cDNA Ends - RACE)

W celu otrzymania pełnych sekwencji nukleotydowych kodujących akwaporyny, wykonano reakcję PCR typu 3' i 5'RACE. Przeprowadzono ją według procedury opisanej przez Frohmana (1993).

4.4.2.1. 3'RACE

W metodzie 3'RACE wykorzystuje się fakt, iż każda cząsteczka mRNA posiada na 3' końcu łańcuch poli(A). W trakcie odwrotnej transkrypcji starter QT, zawierający w swej sekwencji trakt poli(T), przyłącza się właśnie do tego fragmentu, dobudowując dodatkowo sekwencję 33 nukleotydów na końcu każdej cząsteczki mRNA. Dobudowana sekwencja wykorzystywana jest jako matryca dla starterów QO i QI wykorzystywanych w kolejnych etapach reakcji RACE.

Reakcję 3'RACE przeprowadzono w dwóch rundach. W pierwszej rundzie, jako matrycę stosowano cDNA. Do mieszaniny dodano komercyjny starter QO do 3'RACE, którego osiemnastonukleotydowa sekwencja jest identyczna z fragmentem dobudowanym na podstawie sekwencji startera QT używanego w trakcie odwrotnej transkrypcji. Drugi starter jest komplementarny do fragmentu sekwencji nukleotydowej akwaporyny. Reakcję o składzie mieszaniny reakcyjnej:

H ₂ O	- 8,7 µl
5x GoTaq® Reaction Buffer	- 4 µl
2 mM dNTP	- 2 µl
25 mM MgCl ₂	- 1,2 µl
10 µM Starter QO	- 1 µl
10 µM Starter f1 3'RACE HpAQP1	- 1 µl
Polimeraza GoTaqG2®	- 0,1 µl
cDNA	- 2 µl

przeprowadzono w objętości 20 µl według następującego profilu termicznego: 94°C-2'/ 48°C-2'/ 72°C-40'// 94°C-30''/ 55°C-30''/ 72°C-1'// 30 cykli/ 72°C-7'.

Otrzymany produkt rozcieńczano dziesięciokrotnie i wykorzystano jako matrycę w drugiej reakcji PCR. Reakcję tę przeprowadzono również w objętości 20 µl, przy takich samych stężeniach poszczególnych odczynników, przy użyciu komercyjnego starter QI do 3'RACE oraz f2 3'RACE HpAQP1 według następującego profilu termicznego: 94°C-2'// 94°C-30''/ 55°C-30''/ 72°C-1'// 30 cykli/ 72°C-7'. Otrzymane produkty były następnie klonowane przy użyciu zestawu TOPO® PCR Cloning (Thermo Scientific).

4.4.2.2. 5'RACE

W przeciwieństwie do 3' końca każdego mRNA, 5' koniec nie posiada łańcucha poli(A), ani żadnego innego fragmentu sekwencji konserwatywnej. Tym samym uzyskanie sekwencji 5'końca wymaga innej procedury.

W celu uzyskania cDNA, potrzebnego do reakcji 5'RACE, podczas odwrotnej transkrypcji wykorzystano starter komplementarny do sekwencji nukleotydowej akwaporyny (odpowiednio r1 5'RACE HpAQP1, r1 5'RACE HpAQP2, r1 5'RACE HpAQP4), a nie starter QT. Reakcję przeprowadzano zgodnie z opisem podanym w punkcie 4.3. Tak przygotowane trzy rodzaje cDNA oczyszczano na kolumnkach Spin Column DNA Cleanup Mini-preps Kit według procedury dostarczonej przez producenta.

W kolejnym etapie do oczyszczonego cDNA dołączano ogon poli(A). W tym celu przeprowadzono następującą reakcję:

oczyszczone cDNA	- 17 µl
terminal transferase 5X buffer	- 5 µl
10 mM dATP	- 2,5 µl

Całość wymieszano przez pipetowanie i inkubowano przez 3 minuty w 94°C. Następnie dodano 25 U terminalnej transferazy (*Promega*) i inkubowano przez 45 minut w 37°C. Reakcję inaktywowano przez 10 minut w temperaturze 70°C. Tak przygotowane cDNA wykorzystano do pierwszej z dwóch reakcji PCR. Mieszanina reakcyjna oraz warunki termiczne były takie same, jak dla pierwszej rundy 3'RACE za wyjątkiem wykorzystanych starterów. Dla wszystkich matryc stosowano starter Vial 8 do 5'RACE oraz odpowiednio r1 5'RACE HpAQP1, r2 5'RACE HpAQP2 oraz r1 5'RACE HpAQP4. Otrzymane produkt rozcieńczano dziesięciokrotnie i wykorzystano, jako matryce w reakcji drugiej rundy 5'RACE. Reakcję tę przeprowadzono również w objętości 20 µl, przy takich samych stężeniach poszczególnych odczynników, przy użyciu komercyjnego startera Vial 9 do 5'RACE oraz r2 5'RACE HpAQP1, r3 5'RACE HpAQP2 oraz r2 5'RACE HpAQP4 według profilu termicznego identycznego, jak dla drugiej rundy 3'RACE. Otrzymane produkty były następnie klonowane przy użyciu zestawu TOPO® PCR Cloning (*Thermo Scientific*).

4.4.3. PCR Touch Up

Amplifikację poszczególnych sekwencji pełnej długości kodujących akwaporyny przeprowadzono za pomocą starterów wyszczególnionych w tabeli w podrozdziale 3.4.3. Startery te wprowadzają na końcach 5' i 3' sekwencje rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne, na końcu 5' sekwencję Kozak oraz na końcu 3' znacznik His-Tag.

Końcowe stężenia reagentów w mieszaninie wynosiły: 0,2 μ M dNTP, 1,2 mM $MgCl_2$, 0,5 μ M startery, 0,5 U/ 10 μ l polimerazy GoTaqG2, a reakcję prowadzono w objętości 20 μ l. Ze względu na sekwencję starterów, namnożenie produktu było możliwe tylko poprzez zastosowanie metody Touch Up PCR. Przyłączanie starterów rozpoczęto od temperatury 50°C, a następnie w każdym cyklu temperatura wzrastała o 1°C. Profil termiczny reakcji był następujący: 94°C-2' // 94°C-30''/ 50°C do 60°C-30''/ 72°C-1'15''// 10 cykli // 94°C-30''/ 60°C-30''/ 72°C-1'15''// 20 cykli/ 72°C-7'.

4.4.4. PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR)

Reakcję prowadzono w objętości 10 μ l z użyciem odczynników z zestawu Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR, 0,5 μ M starterów oraz 1 μ l cDNA jako matrycy. Jako gen referencyjny stosowano sekwencję kodującą czynnik elongacyjny 1 (EF1). Reakcję przeprowadzano w aparacie Rotor-Gene 6000 (*Corbett Life Science*) według następującego programu termicznego: 94°C-10' // 94°C-20''/ 55°C-30''/ 72°C-30''// 40 cykli/ 72°C-7'/ 75°C-95°C-10'. Ostatni etap profilu termicznego umożliwiał wyznaczenie krzywej topnienia, która pozwalała określać specyficzność reakcji oraz obecność zanieczyszczeń w postaci tworzących się struktur typu primer-dimer. Każdą reakcję prowadzono w pięciu powtórzeniach biologicznych i dwóch powtórzeniach technicznych. Do opracowania wyników stosowano program Miner (<http://miner.ewindup.info/>).

4.5. Elektroforeza kwasów nukleinowych

Rozdziały elektroforetyczne przeprowadzano w 1% żelu agarozowym. Żel został przygotowany z wykorzystaniem buforu TAE. Analizowane próby przed nałożeniem mieszane były z barwnikiem 6x SB zawierającym barwnik GelRed. Elektroforezę prowadzono przy natężeniu 90 mA.

4.6. Oczyszczanie DNA

4.6.1. Oczyszczanie produktów PCR z żelu agarozowego

Oczyszczanie produktów PCR z żelu agarozowego przeprowadzono za pomocą zestawu EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction zgodnie z procedurą dostarczoną przez producenta.

4.6.2. Oczyszczanie DNA z mieszaniny reakcyjnej

Po trawieniu enzymami restrykcyjnymi produkty reakcji PCR oraz wektor pYX142 oczyszczano za pomocą zestawu Spin Column DNA Cleanup Mini-preps zgodnie z procedurą dostarczoną przez producenta.

4.7. Powielanie produktów PCR metodą transformacji komórek bakteryjnych

4.7.1. Klonowanie i transformacja z wykorzystaniem wektora TOPO

Produkty otrzymane w wyniku reakcji RACE wymagają klonowania w celu ich sekwencjonowania. Użyto do tego zestawu TOPO® PCR Cloning, a reakcję ligacji i transformacji wykonano zgodnie z procedurą dostarczoną przez producenta. Dodatkowo do pożywek stałych dodano 40 µl IPTG [24 mg/ml] oraz 60 µl x-Gal [20 mg/ml], dzięki którym możliwe było odróżnienie komórek bakteryjnych zainfekowanych pustym wektorem (niebieskie kolonie), od komórek z wektorem zawierającym wbudowany produkt (białe kolonie).

Kolonie bakteryjne zawierające wektor z wbudowanym insertem były przeszczepiane na szalki ze świeżą pożywką, które inkubowano przez noc w temperaturze 37°C oraz równocześnie przenoszone do probówki zawierającej 20 µl wody. Następnie probówki te inkubowano przez 15 minut w temperaturze 95°C, a tak uzyskane matryce wykorzystano do reakcji PCR. Przeprowadzono ją w objętości 10 µl przy użyciu komercyjnych starterów M13, komplementarnych do sekwencji wektora otaczającej wbudowany insert. Następnie produkty, wymieszane z barwnikiem GelRed, rozdzielano na 1% żelu agarozowym. Wybrane produkty zostały sekwencjonowane z użyciem startera M13F.

4.7.2. Klonowanie i transformacja z wykorzystaniem wektora pYX142

4.7.2.1. Trawienie enzymami restrykcyjnymi

Wektor pYX142 oraz sekwencje nukleotydowe obejmujące pełne ramki odczytu kodujące akwaporyny wraz z dobudowanymi na końcach 5' i 3' miejscami rozpoznawanymi przez enzymy restrykcyjne były trawione mieszaniną enzymów EcoRI i EcoRV (HpAQP6) lub MluI i EcoRV (HpAQP1-HpAQP5). Profil termiczny reakcji, zgodny z zaleceniami producenta, obejmował 5 minut inkubacji w 37°C oraz 5 minut w 80°C w celu inaktywacji enzymów. Po trawieniu produkty reakcji oczyszczano

z wykorzystaniem kolumnienek, a następnie mierzono stężenie DNA metodą spektrofotometryczną przy użyciu NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000.

4.7.2.2. Ligacja

Ligację przeprowadzano, zgodnie z procedurą dostarczoną przez producenta ligazy, z użyciem 50 ng wektora pYX142, a stosunek wektora do insertu wynosił 1:2. Ze względu na różny charakter końców uzyskanych po trawieniu (lepkie końce – MluI i EcoRI oraz tępe końce – EcoRV) reakcję prowadzono dwuetapowo. W pierwszym etapie mieszaninę wektora i insertu inkubowano przez 5 minut w temperaturze 45°C. Następnie przenoszono na lód i dodawano 1 µl T4 DNA Ligase buffer oraz 200 U T4 DNA Ligase. Całość inkubowano przez noc w 16°C.

4.7.2.3. Transformacja komórek bakteryjnych

Transformacje prowadzono zgodnie z procedurą dostarczoną przez producenta komórek kompetentnych One Shot® TOP10. Do 1 µl mieszaniny ligacyjnej dodawano 10 µl komórek, a następnie inkubowano w lodzie przez 30 minut. Po upływie tego czasu, w celu przeprowadzenia szoku cieplnego, inkubowano 1 minutę w temperaturze 42°C. Ponownie przenoszono do lodu i dodawano 100 µl płynnej pożywki LB bez antybiotyku i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 37°C. Następnie całość wysiewano na szalkę z pożywką LB+ ampicylina i hodowano przez noc w temperaturze 37°C.

Kolonie przeszczepiano na szalki ze świeżą pożywką i inkubowano przez noc w temperaturze 37°C oraz równocześnie bakterie przenoszono do probówek zawierających 20 µl wody. Następnie probówki te inkubowano przez 15 minut w temperaturze 95°C, a tak uzyskane matryce wykorzystywano do reakcji PCR. Przeprowadzono ją w objętości 10 µl przy użyciu starterów wyszczególnionych w tabeli w podrozdziale 3.4.3. Następnie mieszaninę reakcyjną rozdzielano na 1% żelu agarozowym. Na podstawie wyniku PCR obserwowanego na żelu wybierano kolonie bakteryjne zawierające wektor z wbudowanym insertem. Takie kolonie przeszczepiano następnie do 50 ml płynnej pożywki LB i wytrząsano przez noc w temperaturze 37°C przy 220 rpm (wytrząsarka Certomat R).

4.8. Izolacja plazmidów

Izolacje plazmidów na średnią skalę prowadzono za pomocą zestawu Presto™ Midi Plasmid według procedury dostarczonej przez producenta z następującymi modyfikacjami. Pierwsza dotyczyła końcowego wirowania, które zamiast 10 minut w temperaturze 4°C przy 15 000x g, trwało 1 godzinę w temperaturze 4°C przy 4000x

g, druga natomiast objętości wody użytej do rozpuszczenia osadu, wynoszącej 100 μ l zamiast 2 ml. Stężenie wyizolowanego plazmidu mierzono metodą spektrofotometryczną przy użyciu NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000.

W kolejnym etapie sekwencjonowano inserty wklonowane do wyizolowanych plazmidów z użyciem odpowiednich starterów wyszczególnionych w tabeli w podrozdziale 3.4.2.

4.9. Transformacja komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

W celu transformacji komórek drożdży *S. cerevisiae* pozbawionych genu *fps1*, komórki te hodowano w 25 ml płynnej pożywki YPD i wytrząsano w kolbach Erlenmeyera (100 ml) w temperaturze 28°C przy 180 rpm do 4 OD/ml ($\lambda = 550$ nm). Pomiar gęstości optycznej (OD/ml) wykonano przy pomocy spektrofotometru BioPhotometer plus (Eppendorf). Następnie hodowlę wirowano przez 5 minut w temperaturze 4°C przy 3000x g. Supernatant usuwano, a osad przemywano 40 ml sterylnej wody i wirowano 5 minut w temperaturze 4°C przy 2500x g. Ponownie supernatant wylewano, a osad przemywano 20 ml sterylnej wody i wirowano jak wyżej. Supernatant ponownie usuwano, a osad rozpuszczano w 5 ml sterylnego 1 M sorbitolu i wirowano przez 5 minut w temperaturze 4°C przy 2000x g. Następnie osad rozpuszczono w 80 μ l sterylnego 1M sorbitolu.

Do kuwetek elektroporacyjnych (0.4 cm, *BioRad*) podawano 5 μ g plazmidu z insertem lub samego plazmidu oraz 40 μ l przygotowanych według powyższej procedury komórek drożdży *S. cerevisiae*. Następnie używając elektroporatora Gene Pulser X cell (*BioRad*) wykonywano elektroporację za pomocą pojedynczego impulsu $V=2.5$ kV, 25 μ F, 200 Ω . Natychmiast po impulsie do kuwetek podawano po 1 ml sterylnego 1 M sorbitolu i całość wylewano na szalki z pożywką izoosmotyczną selekcyjną. Inkubowano przez 4 dni w temperaturze 28°C. Po tym czasie pojedyncze kolonie ponownie przesiewano na nowe szalki z tą samą pożywką i inkubowano przez 4 dni w temperaturze 28°C. Z takich szalek pobierano pojedyncze kolonie do dalszych analiz.

4.10. Testy funkcjonalności akwaporyn

4.10.1. Transport wody

Pojedyncze kolonie komórek drożdży *S. cerevisiae* hodowano w płynnej pożywce izoosmotycznej selekcyjnej i wytrząsano w kolbach Erlenmeyera (100 ml)

przez noc w temperaturze 28°C przy 180 rpm. Następnie wykonywano pomiar gęstości optycznej (OD) i w świeżej próbówce typu Eppendorf rozcieńczano hodowlę za pomocą wody do 1 OD/ml ($\lambda = 550$ nm). Następnie wykonywano serię dziesięciokrotnych rozcieńczeń (1:10, 1:100, 1:1000), które nakraplano (po 15 μ l) na szalki z pożywką selekcyjną izoosmotyczną (YNB) i hipoosmotyczną (YNB –sorbitol) i inkubowano przez 4 dni w temperaturze 28°C. Następnie analizowano różnice we wzroście komórek w zależności od rodzaju pożywki. Eksperyment przeprowadzono stosując trzykrotne powtórzenia biologiczne.

4.10.2. Transport nadtlenu wodoru

Pojedyncze kolonie komórek drożdży *S. cerevisiae* hodowano w płynnej pożywkę izoosmotycznej selekcyjnej i wytrząsano w kolbach Erlenmeyera (100 ml) przez noc w temperaturze 28°C przy 180 rpm. Następnie wykonywano pomiar OD i w świeżej kolbie rozcieńczano hodowlę za pomocą pożywki izoosmotycznej selekcyjnej, aby uzyskać 20 ml hodowli o 1 OD/ml ($\lambda = 550$ nm). Do kolby podawano H₂O₂ o końcowym stężeniu 2,5 mM i wytrząsano przez 2 h w temperaturze 28°C przy 180 rpm. Następnie pobierano 1 ml hodowli, wykonywano z niego serię dziesięciokrotnych rozcieńczeń i nakraplano (po 15 μ l) na szalki z pożywką izoosmotyczną selekcyjną (YNB). Szalki inkubowano przez 4 dni w temperaturze 28°C, a po upływie tego czasu, analizowano różnice we wzroście komórek. Eksperyment przeprowadzono stosując trzykrotne powtórzenia biologiczne.

4.10.3. Transport glicerolu

Pojedyncze kolonie komórek drożdży *S. cerevisiae* zaszczipiano na płynną pożywkę izoosmotyczną selekcyjną (YNB) i wytrząsano w kolbach Erlenmeyera (100 ml) przez noc w temperaturze 28°C przy 180 rpm. Następnie wykonywano pomiar OD i w świeżej kolbie rozcieńczano hodowlę za pomocą pożywki izoosmotycznej selekcyjnej, aby uzyskać 20 ml hodowli o 0,5 OD/ml i ponownie wytrząsano w temperaturze 28°C przy 180 rpm do otrzymania hodowli o 1 OD/ml ($\lambda = 550$ nm). Z takiej hodowli pobierano 1 ml i wirowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej przy 2000x g. Pobierano supernatant, rozcieńczano stukrotnie i oznaczano stężenie glicerolu za pomocą zestawu Glycerol assay kit według procedury dostarczonej przez producenta. Pomiar fluorescencji wykonywano za pomocą fluorymetru Synegru H1 Hybrid Reader (*Thermo Scientific*). Eksperyment przeprowadzono stosując trzykrotne powtórzenia biologiczne.

4.11. Analiza bioinformatyczna

4.11.1. Identyfikacja otwartych ramek odczytu w sekwencjach nukleotydowych otrzymanych w wyniku sekwencjonowania transkryptomu

Dane otrzymane z sekwencjonowania transkryptomu zostały wykorzystane do utworzenia własnej bazy sekwencji nukleotydowych w programie BioEdit. Następnie bazę tę przeszukano używając narzędzia *Local BLAST tblastx*, stosując jako sekwencje referencyjną następujące sekwencje: LsAQP1 (GeneBank: KF157952), AQP-Bom2 (GeneBank: AB245966) oraz hAQP1 (GeneBank: NM_198098). Nie wszystkie wyszukane sekwencje były kompletne (brak 5' i/lub 3'końca), stąd potrzebne było zastosowanie metody RACE PCR w celu identyfikacji brakujących fragmentów.

4.11.2. Translacja *in silico* i zestawienie sekwencji aminokwasowych

Pełne sekwencje nukleotydowe kodujące akwaporyny, uzyskane ze złożenia danych pochodzących z sekwencjonowania transkryptomu oraz reakcji RACE, analizowano za pomocą programu ORF Finder (www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html) w celu zidentyfikowania otwartych ramek odczytu. Na tej podstawie, za pomocą programu BioEdit, wykonano translację *in silico*. Otrzymane sekwencje aminokwasowe zestawiono korzystając z dwóch programów. Pierwszy, ClustalW, używany był jako podstawowe narzędzie podczas prowadzonych analiz. Natomiast zestawienia uzyskane za pomocą drugiego programu, PRALINE, były używane tylko do budowania drzew filogenetycznych.

4.11.3. Charakterystyka sekwencji aminokwasowych

W celu charakterystyki sekwencji aminokwasowych wykonano szereg analiz bioinformatycznych obejmujących:

- 1) Wyznaczenie potencjalnych miejsc fosforylacji - program NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) oraz NetPhosK 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>).
- 2) Wyznaczenie potencjalnych miejsc glikozylacji – program NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).
- 3) Wyznaczenie hydrofobowego plotu – program ProtScale przy zastosowaniu wielkości okna równej 9 (<http://web.expasy.org/protscale/>).

4.11.4. Modelowanie struktury przestrzennej białek

Modelowanie struktury przestrzennej białek wymagało użycia następujących programów i narzędzi:

- 1) Genesilico Metaserver – narzędzie do przewidywania struktury i funkcji białek wskazujące na podstawie jakiego białka zdeponowanego w bazie RCSB Protein Data Bank należy tworzyć model przestrzenny nowego białka (<https://genesilico.pl/meta2>)
- 2) Swiss-PdbViewer – program do wizualizacji struktury trzeciorzędowej białek, umożliwiający importowanie danych zarówno w formacie *.pdb (wzorzec, na podstawie którego modelowane jest białko), jak i *.fasta (sekwencja białka modelowanego). Stosując komendę *Aligned Raw Sequence* program nakłada sekwencję białka modelowanego na wzorzec. Uzyskana cząsteczka jest następnie analizowana przez program Modeller (<https://genesilico.pl/toolkit/unimod?method=Modeller>), który tworzy wstępny model białka. W kolejnym etapie otrzymany model zostaje poddany ocenie przy użyciu programu MetaMQAPII (<https://genesilico.pl/toolkit/unimod?method=MetaMQAPII>). Otrzymane dane importuje się ponownie do programu Swiss-PdbViewer i używając komendy *Iterative Magic Fit* tworzy model struktury przestrzennej białka.
- 3) ProQ – program oceniający jakość utworzonego modelu struktury przestrzennej białka (<http://www.sbc.su.se/~bjornw/ProQ/ProQ.html>).
- 4) PyMol - program do wizualizacji struktury trzeciorzędowej białek.
- 5) PoreWalker – narzędzie charakteryzujące wnętrze kanału tworzonego przez białka transbłonowe (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PoreWalker/>).

4.11.5. Analiza filogenetyczna

Zestawienia sekwencji, potrzebnych do wykonania drzew filogenetycznych, wykonano przy użyciu programu PRALINE (<http://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww>). Używano tego programu, gdyż jest on dedykowany przyrównaniom sekwencji, które wykazują niskie podobieństwo. Drzewa filogenetyczne konstruowano za pomocą programu MEGA6, stosując metodę odległościową, tzw. metodę łączenia sąsiadów (z ang. Neighbour Joining, NJ). Rzetelność drzewa filogenetycznego otrzymanego przy pomocy tej metody była szacowana przy użyciu metody samopróbkowania (z ang. bootstrap).

4.12. Statystyczna analiza danych

W celu określenia zmian poziomu ekspresji genów kodujących akwaporyny w trakcie zapadania ślimaka w stan estywacji zastosowano standardowe metody statystyczne. Teoretyczne podstawy przeprowadzonej analizy zawarte są w podręcznikach Zara (1999) oraz Socala i Rohlf (1995). Układ eksperymentalny obejmował 5 grup łącznie z kontrolą (Materiały, 3.1.1.), dlatego w celu porównania średniego poziomu ekspresji genów akwaporyn pomiędzy pięcioma grupami zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Średnie wartości ekspresji genów poddane analizie wariancji pochodziły z pięciu powtórzeń biologicznych ($n = 5$) w każdej grupie (Metody, 4.4.4.). W celu uszczegółowienia ANOVA zastosowano test *post-hoc* Tukeya RiR, którego celem było wykazanie różnic pomiędzy poszczególnymi grupami. Przy prezentacji wyniku testu ANOVA posłużono się statystyką F (Zar 1999), a w indeksie dolnym podano stopnie swobody: (1) między grupami i (2) wewnątrz grup. Hipotezę zerową dla testów statystycznych wskazującą na brak różnic między grupami odrzucano na poziomie istotności $\alpha < 0.05$. Dokładny poziom tego prawdopodobieństwa wskazano odpowiednio przy każdej wartości statystyki testowej.

4.13. Usługi

Reakcje sekwencjonowania oraz syntezy oligonukleotydów potrzebnych do badań były wykonywane przez następujące firmy:

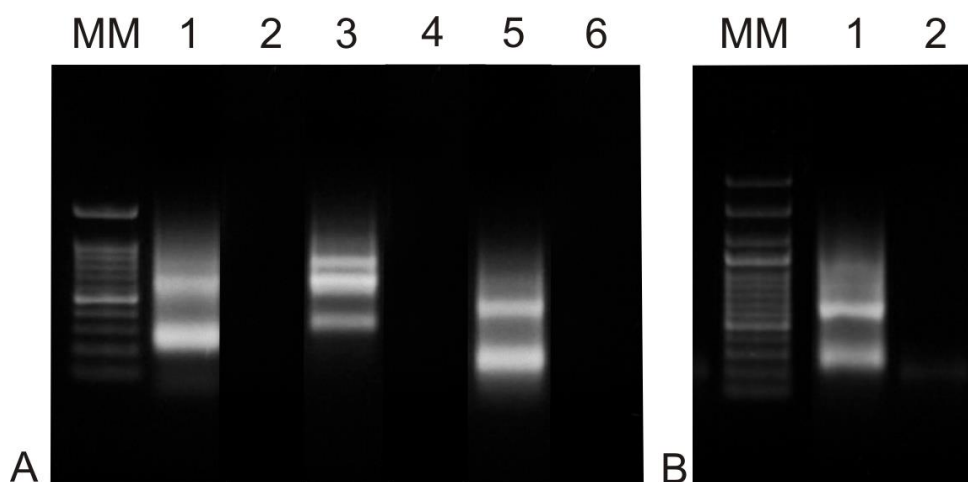
- a) Sekwencjonowanie transkryptomu - BGI TECH Solution w Hongkongu (Illumina HiSeq2000).
- b) Sekwencjonowanie produktów PCR - Wydziałowa Pracownia Techniki Biologii Molekularnej, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu (3130xC Genetic Analyzer *Applied Biosystems*).
- c) Synteza oligonukleotydów - Pracownia Sekwencjonowania i Syntezy Oligonukleotydów, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie oraz firma *Sigma-Aldrich*.

5. WYNIKI

5.1. Identyfikacja sekwencji nukleotydowych kodujących akwaporyny ślimaka winniczka

W wyniku sekwencjonowania transkryptomu *H. pomatia* (Materiały, 3.9) uzyskano 238 320 „kontigów”, czyli sklonowanych fragmentów DNA, które mają zachodzące na siebie regiony. Sekwencje te złożono w dłuższe fragmenty, zwane „unigene”, stanowiące zestaw transkryptów, z których utworzono następnie bazę danych zawierającą 128 298 sekwencji. Dane te wchodziły w skład bazy zamieszczonej na stronie <http://rhesus.amu.edu.pl/mollusca/index.php>. W bazie tej wyszukano sześć sekwencji *H. pomatia*, wykazujących podobieństwo do sekwencji kodujących akwaporyny, które nazwano *HpAQP1*-*HpAQP6* (Metody, 4.11.1). Sekwencje *HpAQP3*, *HpAQP5* i *HpAQP6* obejmowały pełne otwarte ramki odczytu wraz z fragmentami UTR5' i UTR3'. Otrzymane sekwencje zestawiono w tabeli (Tab. 2).

W przypadku sekwencji *HpAQP1*, *HpAQP2* oraz *HpAQP4* otrzymane ramki odczytu nie były pełne. W celu identyfikacji brakujących fragmentów sekwencji przeprowadzono reakcje RACE (Metody, 4.4.2). Wyniki reakcji 5'RACE i 3'RACE przedstawiono na zdjęciu (Ryc. 6).



Ryc. 6. Wynik rozdziłu elektroforetycznego na 1% żelu agarozowym produktów reakcji RACE. (A) MM – Marker Mas 100bp DNA Ladder Plus; 1, 3, 5 – produkt reakcji 5'RACE dla *HpAQP1*, *HpAQP2* i *HpAQP4*; 2, 4, 6 – reakcje kontrolne przeprowadzone z wykorzystaniem 1 μ l wody jako matrycy. (B) 1 – produkt reakcji 3'RACE dla *HpAQP1*; 2 – reakcja kontrolne przeprowadzona z wykorzystaniem 1 μ l wody jako matrycy

Długości pełnych sekwencji kodujących *HpAQP1*, *HpAQP2* oraz *HpAQP4*, otrzymane po uwzględnieniu wyników sekwencjonowania produktów reakcji RACE (Metody, 4.4.2) zestawiono w tabeli 2.

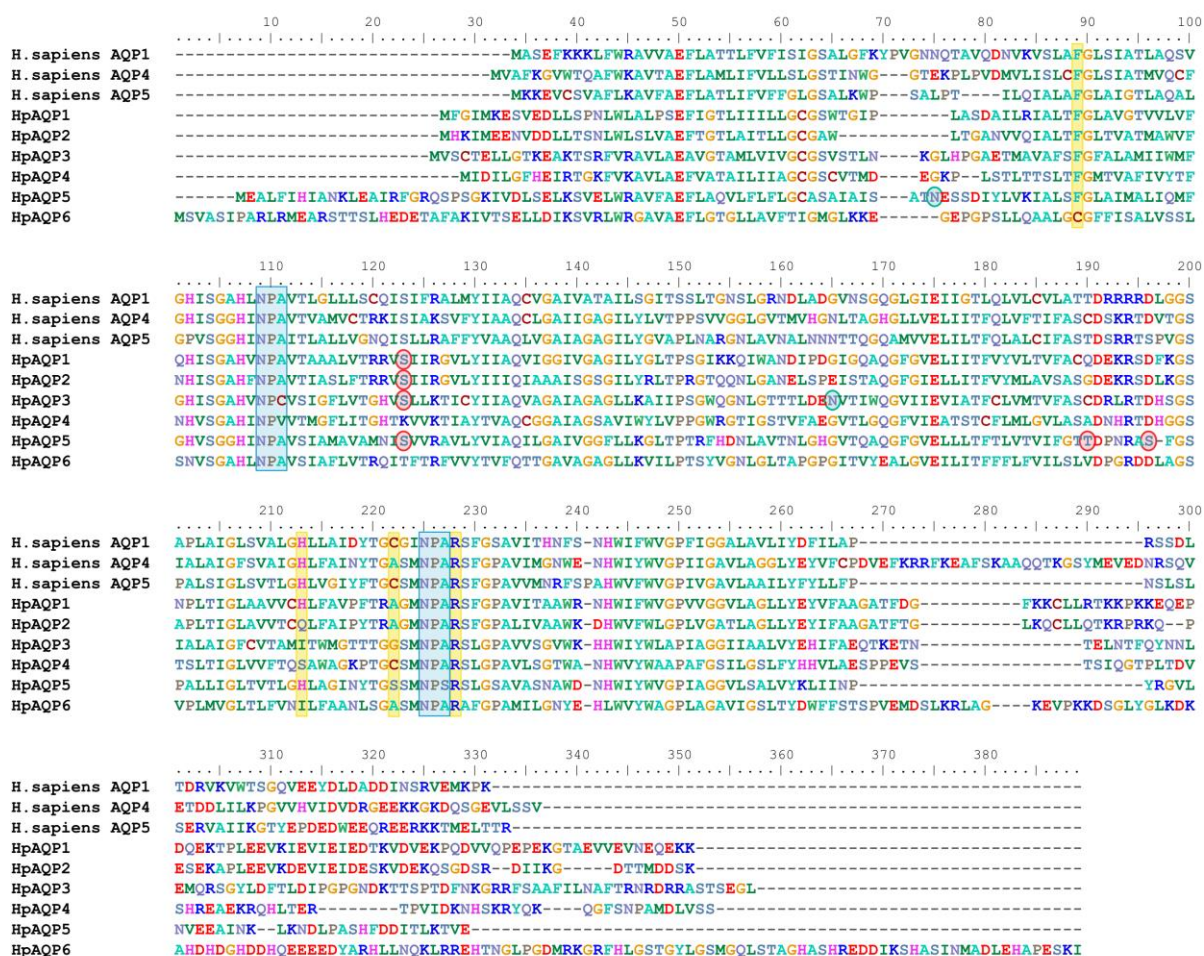
Tab. 2. Długości sekwencji nukleotydowych (wyrażone liczbą par zasad) kodujących potencjalne akwaporyny (*HpAQP1*-*HpAQP6*)

Sekwencja	Długości sekwencji nukleotydowych uzyskane z sekwencjonowania transkryptomu			Długości sekwencji nukleotydowych uzyskane z reakcji RACE			Długości pełnych sekwencji nukleotydowych		
	UTR 5'	ORF	UTR 3'	UTR 5'	ORF	UTR 3'	UTR 5'	ORF	UTR 3'
<i>HpAQP1</i>	-	221	-	164	700	35	164	921	35
<i>HpAQP2</i>	-	748	445	172	134	-	172	882	445
<i>HpAQP3</i>	2	933	134	-	-	-	2	933	134
<i>HpAQP4</i>	-	718	85	76	152	-	76	870	85
<i>HpAQP5</i>	289	864	1119	-	-	-	289	864	1119
<i>HpAQP6</i>	491	1134	178	-	-	-	491	1134	178

5.2. Charakterystyka bioinformatyczna sekwencji aminokwasowych akwaporyn otrzymanych *in silico*

5.2.1. Translacja *in silico* sekwencji kodujących akwaporyny

Wyznaczone wcześniej otwarte ramki odczytu stanowiące sekwencje nukleotydowe kodujące *HpAQP1-HpAQP6* (Ryc. 7) przepisano *in silico* (Metody, 4.11.1) na sekwencje aminokwasowe. W wyniku translacji otrzymano sześć polipeptydów: *HpAQP1* zbudowany z 307 aminokwasów, *HpAQP2* z 294, *HpAQP3* z 311, *HpAQP4* z 290, *HpAQP5* z 288 oraz *HpAQP6* z 378 (Ryc. 8, Tab. 3). Dalsze analizy bioinformatyczne oraz badanie funkcjonalności w drożdżach *S. cerevisiae* wykonywane były w oparciu o te sekwencje.



Ryc. 8. Zestawienie sekwencji aminokwasowych akwaporyn *H. pomatia* oraz ludzkich AQP1, AQP4 oraz AQP5 wykonanej za pomocą programu ClustalW. Na rycinie zaznaczono motywy NPA - niebieskie ramki, aminokwasy budujące filtr selektywności - żółte ramki, potencjalne miejsca fosforylacji - czerwone kółka oraz potencjalne miejsca glikozylacji - zielone kółka

5.2.2. Identyfikacja motywów strukturalnych charakterystycznych dla akwaporyn

Do motywów strukturalnych charakterystycznych dla akwaporyn należą dwa motywy NPA (asparagina-prolina-alanina) i aminokwasy budujące filtr selektywności ar/R (Wstęp, 1.2). W celu sprawdzenia czy te elementy są zawarte w sekwencjach aminokwasowych przewidywanych dla akwaporyn *H. pomatia* (Ryc. 8), wykonano ich zestawienie przy wykorzystaniu programu ClustalW (Metody, 4.11.2). Jako punkt odniesienia wybrano dobrze scharakteryzowane akwaporyny człowieka (AQP1, AQP4 oraz AQP5). Wykonane zestawienie pozwoliło porównać akwaporyny ślimacze zarówno z tymi dobrze poznanymi białkami, jak również między sobą i na tej podstawie wyznaczono pozycje zajmowane przez elementy konserwatywne.

Jak pokazano na Ryc. 8, przeprowadzona analiza pozwoliła stwierdzić, że trzy spośród akwaporyn przewidywanych dla *H. pomatia* (HpAQP1, HpAQP2 oraz HpAQP6) zawierają dwa motywy NPA o najbardziej konserwatywnej sekwencji, czyli asparagina-prolina-alanina. W trzech pozostałych białkach stwierdzono zmiany aminokwasu w trzeciej pozycji motywu. W przypadku białek HpAQP3 i HpAQP4 w pierwszym motywie NPA zamiast alaniny występuje odpowiednio cysteina oraz walina (NPC oraz NPV), natomiast w przypadku białka HpAQP5 w drugim motywie NPA w trzeciej pozycji występuje seryna (NPS).

Zestawienie sekwencji aminokwasowych umożliwiło także wyznaczenie aminokwasów budujących filtr selektywności. Do analizy tego regionu wykorzystano bazę MIPModDB, która obejmuje 1008 sekwencji białek MIP pochodzących z 341 organizmów. Dla każdej sekwencji wyznaczone są motywy NPA oraz skład aminokwasowy filtra selektywności. Struktura filtra selektywności może z kolei sugerować rodzaj transportowanej przez analizowaną akwaporynę substancji, a co za tym idzie przynależność badanego białka do konkretnej grupy akwaporyn. Opierając się o dane zawarte we wspomnianej bazie dokonano analizy zidentyfikowanych białek.

Wyznaczony filtr selektywności HpAQP1 i HpAQP5 zbudowany jest z fenyloalaniny, histydyny, alaniny/seryny oraz argininy (odpowiednio FHAR oraz FHSR). Taki filtr selektywności wskazuje na przynależność tych białek do grupy akwaporyn typu AQP1 (Gupta i in. 2012). Z kolei białka HpAQP3 oraz HpAQP4 zawierają filtr selektywności zbudowany z fenyloalaniny, izoleucyny/seryny, glicyny/cysteiny oraz argininy (odpowiednio FIGR oraz FSCR). Zdeponowane w bazie MIPModDB sekwencje posiadające filtry o takim składzie należą do grupy akwaporyn typu AQP3, co sugeruje, że białka HpAQP3 oraz HpAQP4 również należą do tej grupy (Gupta i in. 2012). Pozostałe dwie akwaporyny, tj HpAQP2 oraz HpAQP6 posiadają filtry selektywności, które nie mają swoich odpowiedników w bazie MIPModDB.

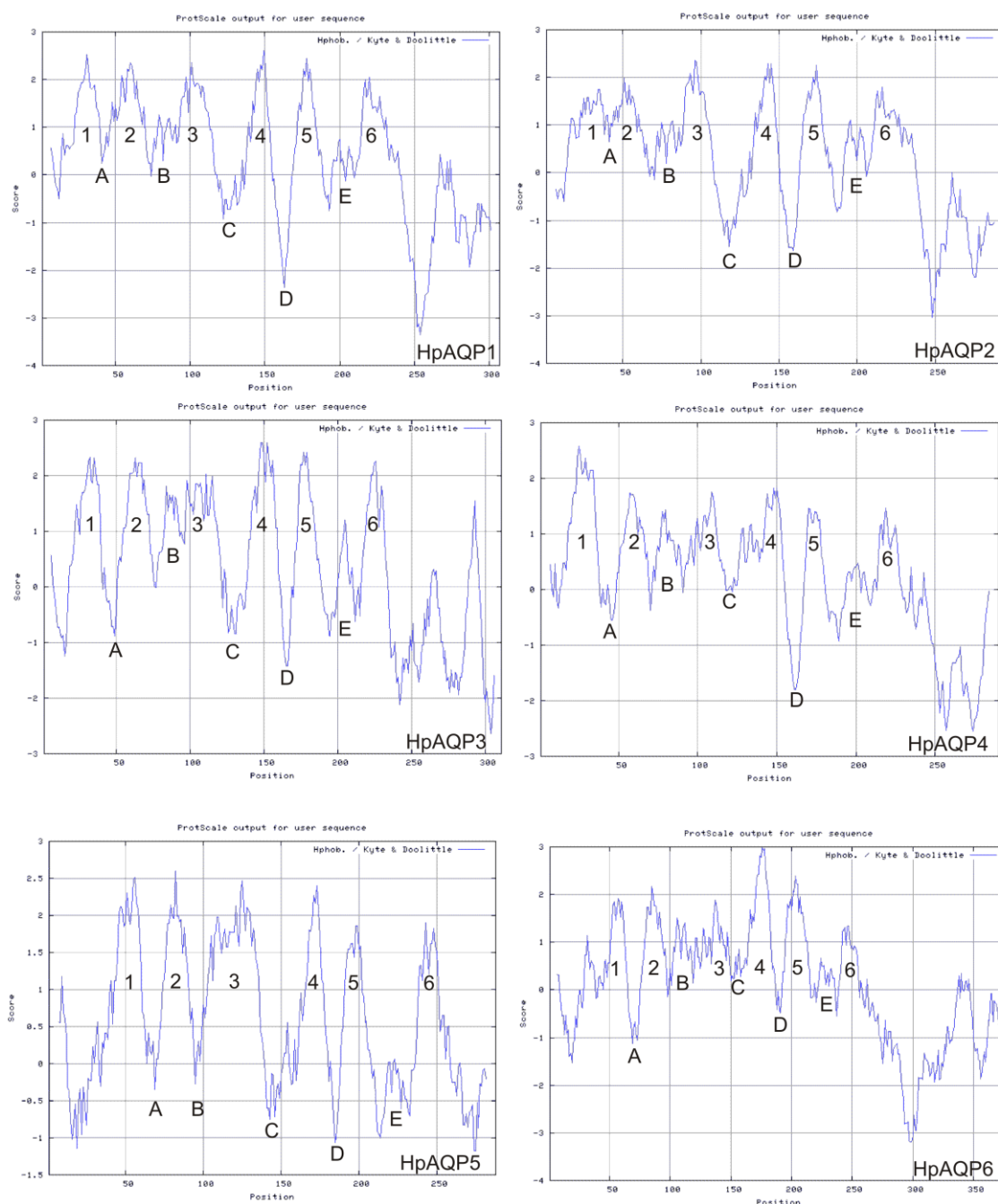
W przypadku HpAQP2 jest on tworzony przez fenyloalaninę, glutaminę, alaninę oraz argininę (FQAR) natomiast w przypadku HpAQP6 przez cysteinę, izoleucynę, alaninę oraz argininę (CIAR). Tym samym nie można przydzielić tych białek do żadnej z wyróżnionych dotąd grup akwaporyn. Ustalenia dotyczące motywu NPA i filtru selektywności w przewidywanych akwaporynach *H. pomatia* zebrano w tabeli (Tab. 3).

Tab. 3. Charakterystyka sekwencji kodujących przewidywane akwaporyny *H. pomatia* (HpAQP1-6) przeprowadzona w oparciu o analizę bioinformatyczną. W tabeli przedstawiono skład aminokwasowy obu motywów NPA i ar/R regionu oraz liczbę aminokwasów budujących poszczególne akwaporyny

Sekwencja kodująca	Pierwszy motyw NPA	Drugi motyw NPA	ar/R region				Liczba aminokwasów
HpAQP1	NPA	NPA	F	H	A	R	307
HpAQP2	NPA	NPA	F	Q	A	R	294
HpAQP3	NPC	NPA	F	I	G	R	311
HpAQP4	NPV	NPA	F	S	C	R	290
HpAQP5	NPA	NPS	F	H	S	R	288
HpAQP6	NPA	NPA	C	I	A	R	378

5.2.3 Określenie profilu hydrofobowości

Określenie profilu hydrofobowości pozwala na wskazanie w strukturze białka elementów o charakterze hydrofobowym i hydrofilowym. Tym samym, określić można liczbę pętli pozabłonowych i domen transbłonowych. Jak pokazano na Ryc. 9, zastosowanie skali Kyte i Doolittle (Metody, 4.11.3) wskazuje na istnienie sześciu domen i pięciu pętli w przypadku przewidywanych akwaporyn *H. pomatia*, co jest typowym wynikiem tego typu analizy dla wszystkich akwaporyn (Wstęp, 1.2).

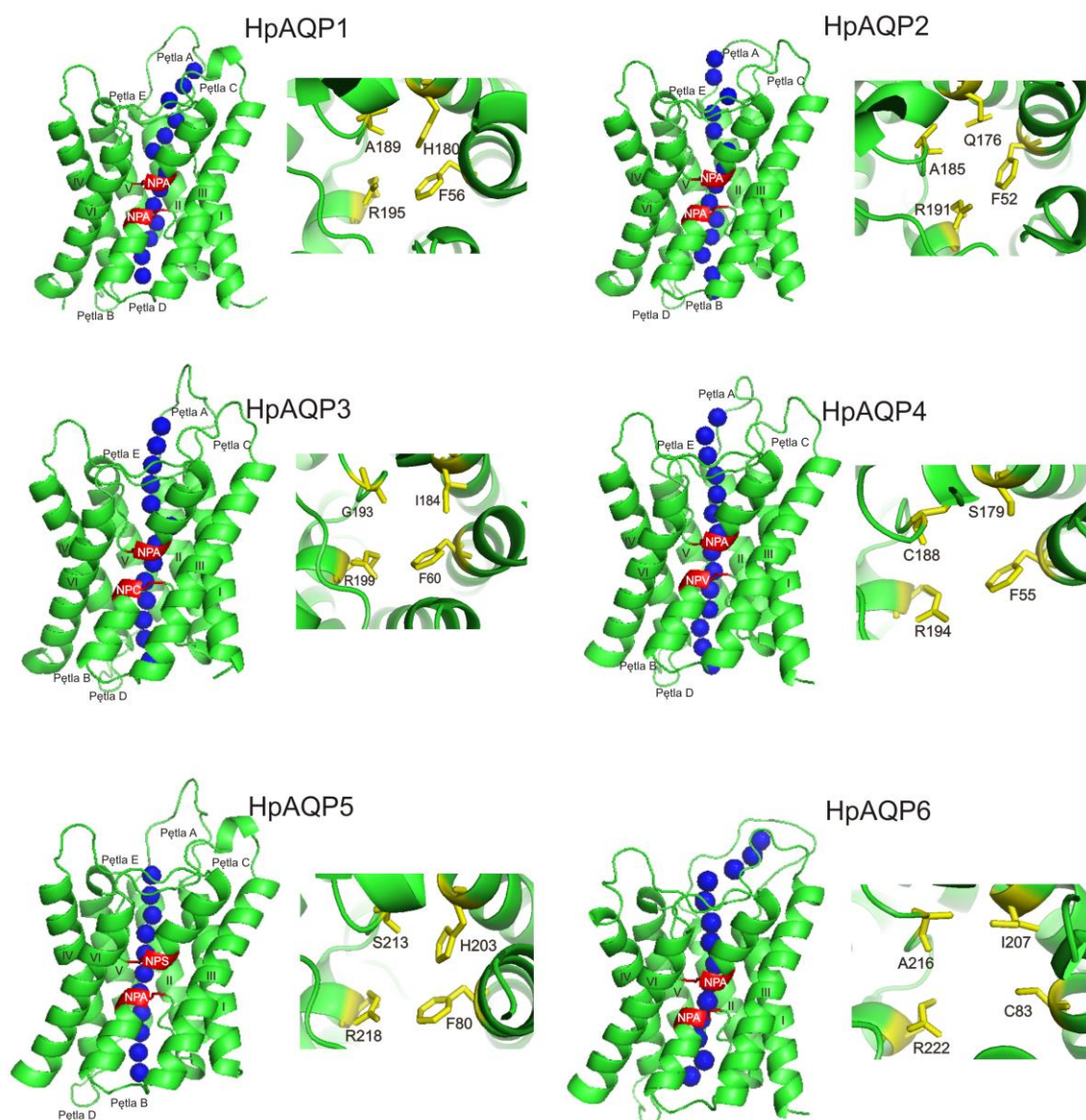


Ryc. 9. Profil hydrofobowości na podstawie skali Kyte and Doolittle dla akwaporyn *H. pomatia* (HpAQP1-6). Cyfry (1-6) oznaczają domeny transbłonowe, a litery (A-E) pętle

5.2.4. Modelowanie struktury przestrzennej

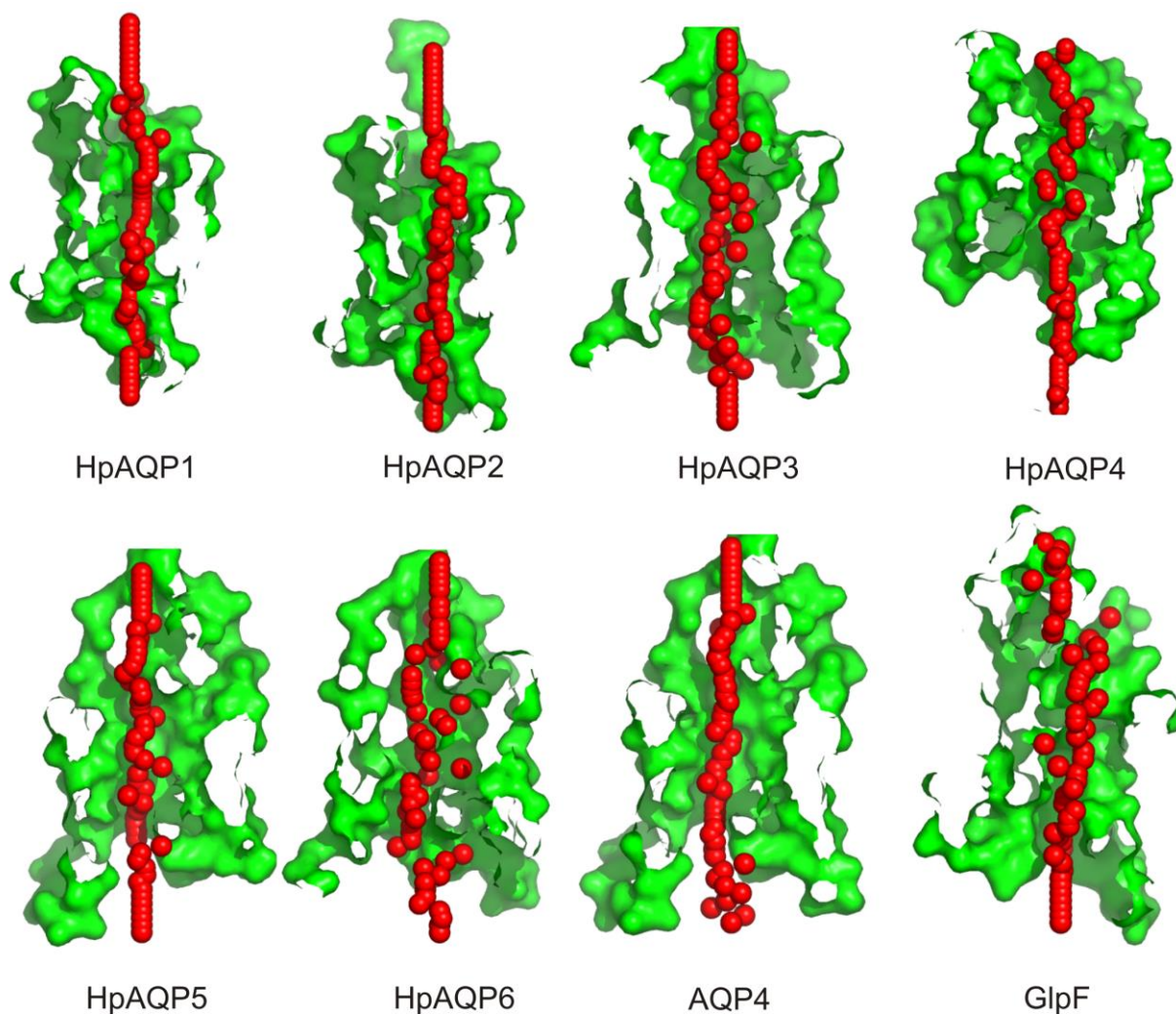
W kolejnym etapie prac bioinformatycznych wykonano modelowanie przestrzenne sekwencji aminokwasowych akwaporyn ślimaka winniczka (Ryc. 10). Modele pokazane na tej rycinie potwierdzają, że wyznaczone na podstawie

zestawienia ClustalW motywy NPA oraz region ar/R (Ryc. 8) tworzą w strukturze przestrzennej przewężenia typowe dla akwaporyn. Uzyskane modele pozwoliły także potwierdzić ustalenia sformułowane na podstawie analizy profilu hydrofobowości (Ryc. 9), dotyczące liczby odcinków transbłonowych oraz liczby i lokalizacji pętli pozabłonowych. Zatem, poddane modelowaniu sekwencje aminokwasowe tworzą strukturę typową dla akwaporyn, dla których charakterystyczna jest obecność sześciu domen transbłonowych i pięciu pętli pozabłonowych. Ponadto wykazano, że elementy konserwatywne, istotne dla transportu, usytuowane są w prawidłowym, określonym na podstawie znanych danych krystalograficznych, miejscu wewnątrz poru.



Ryc. 10. Modele struktury przestrzennej z uwzględnieniem motywu NPA (po lewej) i filtra selektywności (powiększony po prawej) dla sekwencji aminokwasowych kodujących białka HpAQP1-HpAQP6. Niebieski element graficzny przedstawia wodę transportowaną przez kanał. A - alanina, H - histydyna, F - fenyloalanina, R - arginina, Q - glutamina, G - glicyna, I - izoleucyna, S - seryna, C - cysteina

Otrzymane modele struktury przestrzennej pozwoliły również wstępnie scharakteryzować por w obrębie analizowanych białek. Do tego celu wykorzystano program PoreWalker (Metody, 4.11.4). Jako próbę referencyjną dla akwaporyn ortodoksyjnych wykorzystano strukturę krystaliczną ludzkiej AQP4, natomiast dla akwagliceroporyn zastosowano białko GlpF z *Escherichia coli*.



Ryc. 11. Wizualizacja prawdopodobnego kształtu porów białek HpAQP1-6 otrzymana za pomocą programu PoreWalker. Zielonym kolorem przedstawiono powierzchnię białka, natomiast za pomocą czerwonego elementu graficznego przedstawiono kształt poru

W wyniku przeprowadzonej analizy otrzymano graficzną wizualizację prawdopodobnego kształtu poru. W przypadku ludzkiej AQP4, oraz HpAQP1, HpAQP2 i HpAQP5 por ma strukturę bardziej regularną i węższą w porównaniu do GlpF, HpAQP3, HpAQP4 oraz HpAQP6, u których struktura poru jest nieregularna. Wynik analizy sugeruje, że białka AQP4, oraz HpAQP1, HpAQP2 i HpAQP5 posiadają por

o mniejszej średnicy, natomiast GlpF, HpAQP3, HpAQP4 oraz HpAQP6 charakteryzują się większą średnicą poru. Biorąc pod uwagę fakt, że średnica poru ma bezpośredni związek z selektywnością transportu (Wstęp, 1.3), można przypuszczać, że przez białka HpAQP1, HpAQP2 i HpAQP5 możliwy jest transport jedynie mniejszych cząsteczek, takich jak woda. Natomiast białka HpAQP3, HpAQP4 i HpAQP6 posiadają możliwość transportu cząsteczek o większych średnicach np. glicerolu (Ryc. 11).

5.2.5. Wyznaczenie potencjalnych miejsc modyfikacji potranslacyjnej akwaporyn

Transport substancji przez akwaporyny podlega regulacji zależnej od kinaz białkowych (Törnroth-Horsefield i in. 2010). W przypadku ludzkich akwaporyn znanych jest kilka miejsc fosforylacji, potwierdzonych eksperymentalnie. Są to, między innymi, seryna 111 w AQP4, fosforylowana przez kinazę białkową zależną od Ca^{2+} /kalomoduliny (CaMKII) oraz seryna 156 w AQP5 i treonina 157 w AQP1, fosforylowane przez kinazę A (Rodrigues i in. 2016; Yukutake i Yasui 2010; Zhang i in. 2007). W celu sprawdzenia, czy akwaporyny *H. pomatia* mogą podlegać takiej regulacji, przeprowadzono analizę potencjalnych miejsc fosforylacji w obrębie zidentyfikowanych sekwencji. Zastosowane programy (Metody, p.4.11.3) wskazały na występowanie 14 potencjalnych miejsc fosforylacji w sekwencji HpAQP1, 28 w HpAQP2, 30 w HpAQP3, 28 w HpAQP4, 21 w HpAQP5 oraz 30 w HpAQP6. Następnie przeanalizowano, które z proponowanych miejsc są dostępne dla kinaz, a więc znajdują się w pętlach wewnątrzkomórkowych oraz na N- i C-końcu. Dla poszczególnych sekwencji znaleziono odpowiednio 9 (HpAQP1), 13 (HpAQP2), 19 (HpAQP3), 11 (HpAQP4), 8 (HpAQP5) oraz 19 (HpAQP6) potencjalnych miejsc fosforylacji. Dla tych pozycji szukano następnie „odpowiedników” wśród miejsc fosforylacji potwierdzonych eksperymentalnie w AQP1, AQP4 i AQP5 człowieka. Znalaziono sześć analogicznych miejsc. Odpowiednikiem seryny 111 w ludzkiej AQP4 są seryny: 90 w HpAQP1, 86 w HpAQP2, 94 w HpAQP3 i 114 w HpAQP5. Wszystkie te aminokwasy zostały wyznaczone przez program NetPhos jako potencjalne miejsca fosforylacji, zlokalizowane w pętli B. Podobnie, odpowiednikiem seryny 156 w ludzkiej AQP5 jest seryna 187 w HpAQP5, która również została wyznaczona przez program NetPhos jako potencjalne miejsce fosforylacji zlokalizowane w pętli D. Również treonina 181 w HpAQP5 wyznaczona przez program NetPhos i zlokalizowana w pętli D może być potencjalnym miejscem fosforylacji, stanowiącym odpowiednik treoniny 157 w ludzkiej AQP1 (Ryc. 8).

Potencjalne miejsca glikozylacji zostały znalezione tylko dla trzech sekwencji aminokwasowych akwaporyn *H. pomatia*. Zastosowanie programu NetNGlyc (Metody,

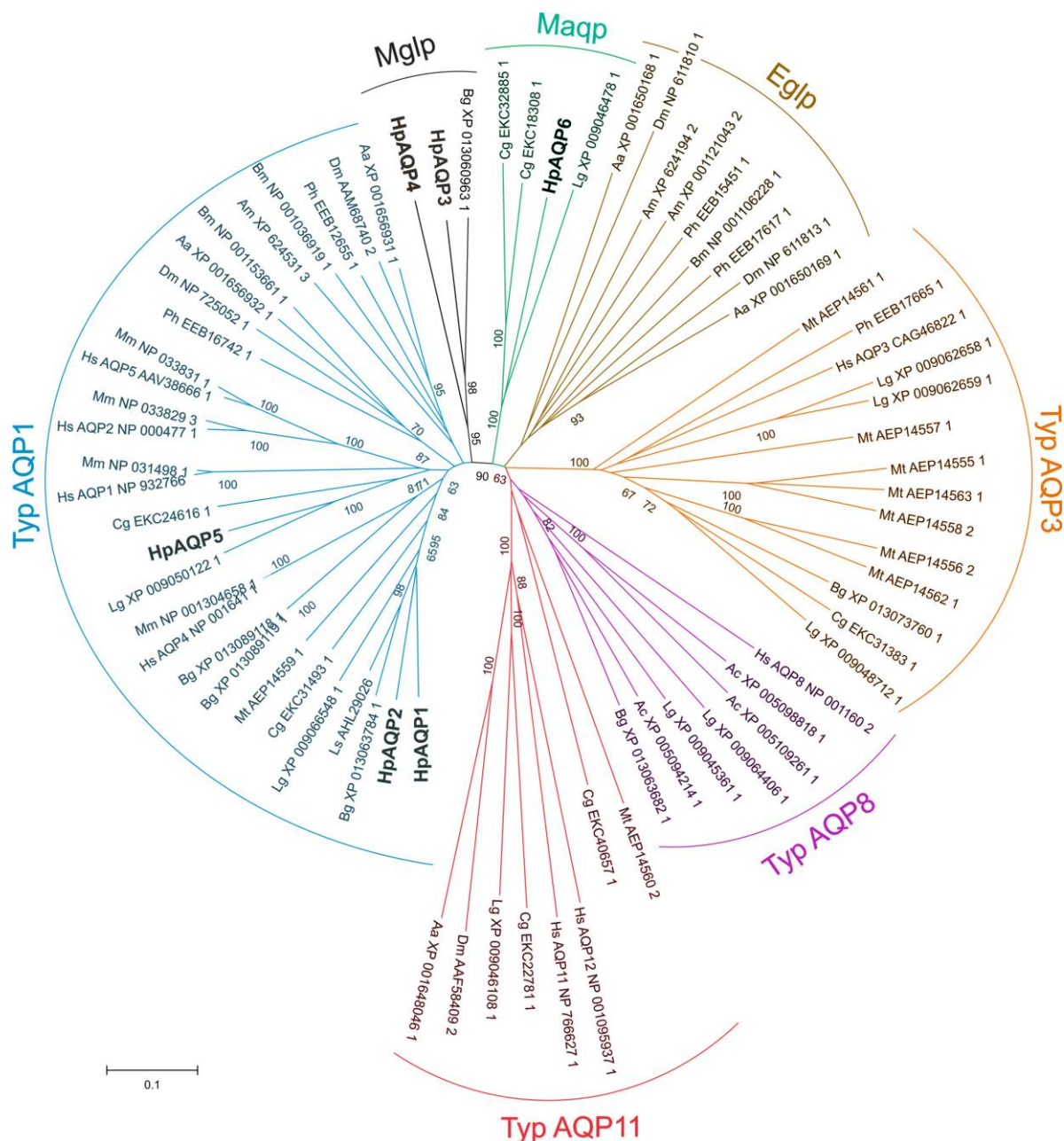
4.11.3) pozwoliło na wyznaczenie jednego takiego miejsca w HpAQP3 (N136), trzech w HpAQP5 (N66, N112 i N208) oraz dwóch w HpAQP6 (N96 i N212). Spośród nich tylko asparagina 136 oraz 66 znajdują się w pętli zewnątrzkomórkowej, więc mogą być rzeczywistym miejscem glikozylacji białka (Ryc. 8).

5.2.6. Analiza filogenetyczna

Analizę filogenetyczną przewidywanych sekwencji aminokwasowych HpAQP1-6 przeprowadzono w celu sprawdzenia możliwości ich przypisania do jednej z czterech proponowanych obecnie grup akwaporyn zwierząt, tj. akwaporyn typu AQP1, AQP3, AQP8, oraz AQP11 (Wstęp, p 1.4). Relacje filogenetyczne pomiędzy potencjalnymi akwaporynami *H. pomatia* a białkami z rodziny MIP zidentyfikowanymi u innych zwierząt analizowano stosując metodę odległościową, tzw. metodę łączenia sąsiadów (z ang. Neighbour Joining, NJ (Metody, 4.11.5.)). Do konstrukcji drzewa filogenetycznego wykorzystano 74 sekwencji aminokwasowych różnych białek MIP, z uwzględnieniem sekwencji aminokwasowych HpAQP1-HpAQP6. Jak pokazano na Ryc. 12 w obrębie drzewa filogenetycznego otrzymano siedem grup. Cztery z nich odpowiadały podstawowym grupom akwaporyn kręgowców (akwaporyny typu AQP1, AQP3, AQP8, oraz AQP11), wśród których znajdowały się również sekwencje kodujące akwaporyny bezkręgowców. Trzy pozostałe grupy zawierały wyłącznie sekwencje bezkręgowców. Jedna obejmowała entomogliceroporyny (EgIp), czyli akwaporyny owadów transportujące glicerol (Wstęp, 1.4.6), a dwie pozostałe utworzone zostały przez sekwencje białek mięczaków. Grupom tym w ramach niniejszej pracy przypisano nazwy własne. W jednej z grup białek mięczaków znajdują się akwaporyny, które podobnie jak EgIp transportują glicerol. Zaproponowano więc, aby analogicznie do grupy EgIp, grupę tę nazwać malakogliceroporynami (MgIp), wśród których są HpAQP3 i HpAQP4. Natomiast druga grupa białek mięczaków zawiera sekwencje akwaporyn, niezdolnych do transportu glicerolu, i w jej przypadku zaproponowano nazwę malakoakwaporyny (Maqp). W grupie tej znajduje się HpAQP6.

W ramach otrzymanego drzewa, sekwencje aminokwasowe HpAQP1-HpAQP6 zostały przypisane do różnych grup. Sekwencje HpAQP1, HpAQP2 oraz HpAQP5 grupują się z akwaporynami należącymi do białek typu AQP1. W grupie tej można wyróżnić cztery podgrupy. Pierwsza obejmuje 9 sekwencji zawierających ssacze akwaporyny AQP1, AQP2 i AQP5. Wśród nich znajduje się również HpAQP5. W skład drugiej podgrupy wchodzi 11 sekwencji wśród których znajdują się między innymi ssacze AQP4 oraz HpAQP1 i HpAQP2. Trzecia i czwarta podgrupa złożona jest z 9 sekwencji owadzich, które obejmują akwaporyny PRIP oraz DRIP (Wstęp, 1.4.1.), przy czym w ich przypadku stwierdzono brak grupowania z białkami HpAQP.

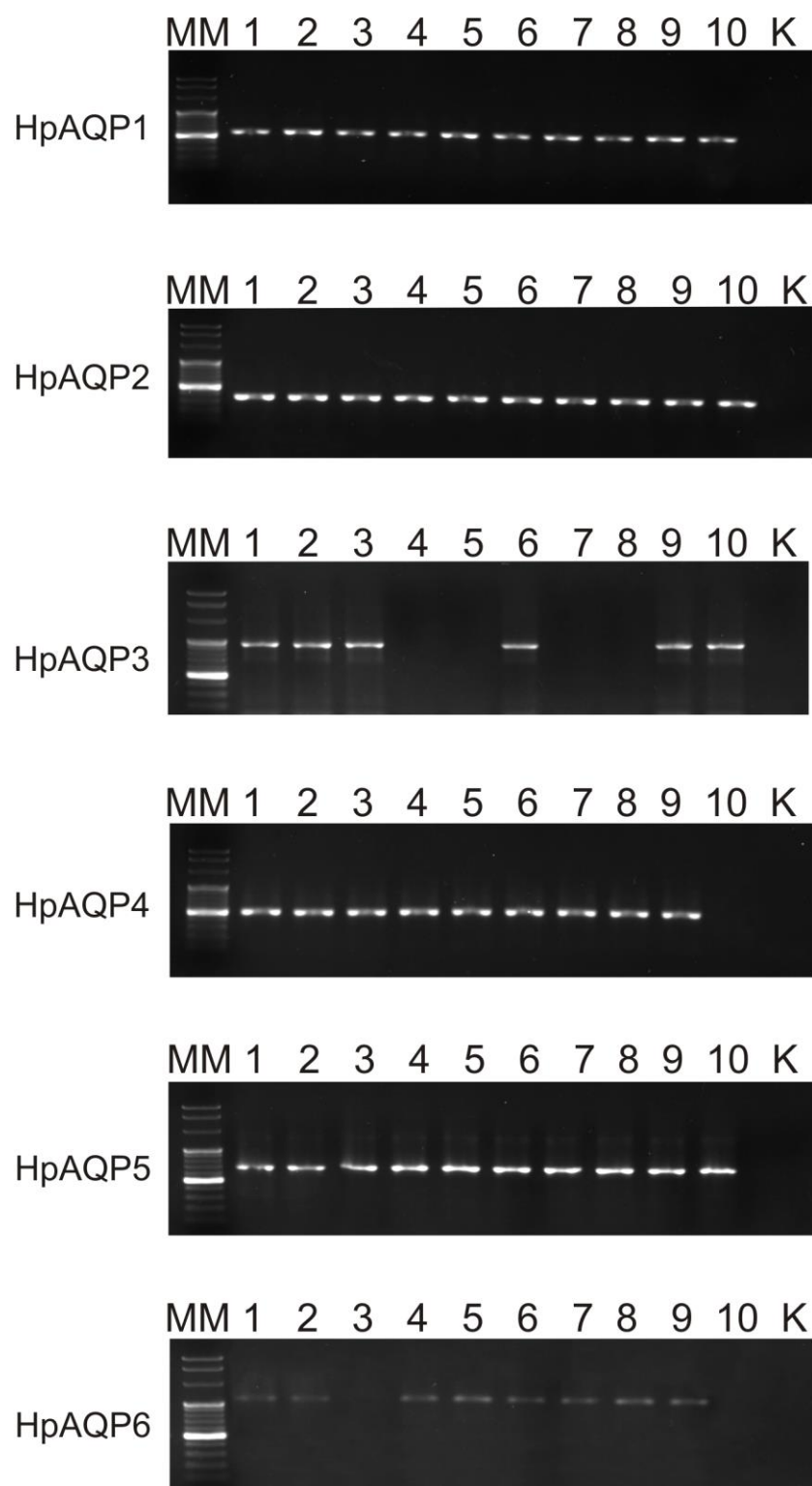
W przypadku grup obejmujących białka należące do typu AQP3, AQP8 i AQP11 znajdują się sekwencje akwaporyn bezkręgowców, jednak żadne ze zidentyfikowanych białek HpAQP.



Ryc. 12. Analiza filogenetyczna przewidywanych sekwencji akwaporyn *H. pomatia* (HpAQP1-HpAQP6). Drzewo zbudowano metodą Neighbour Joining na podstawie 74 sekwencji. Stosowane skróty: Aa - *Aedes aegypti*; Ac - *Aplysia californica*; Am - *Apis mellifera*; Bm - *Bombyx mori*; Bg - *Biomphalaria glabrata*; Cg - *Crassostrea gigas*; Dm - *Drosophila melanogaster*; Hp - *Helix pomatia*; Hs - *Homo sapiens*; Lg - *Lottia gigantea*; Ls - *Lymnaea stagnalis*; Mm - *Mus musculus*; Mt - *Milnesium tardigradum*; Ph - *Pediculus humanus* (Kosicka i in. 2016, zmodyfikowano)

5.3. Wyznaczenie profilu organo-specyficznej ekspresji genów kodujących akwaporyny

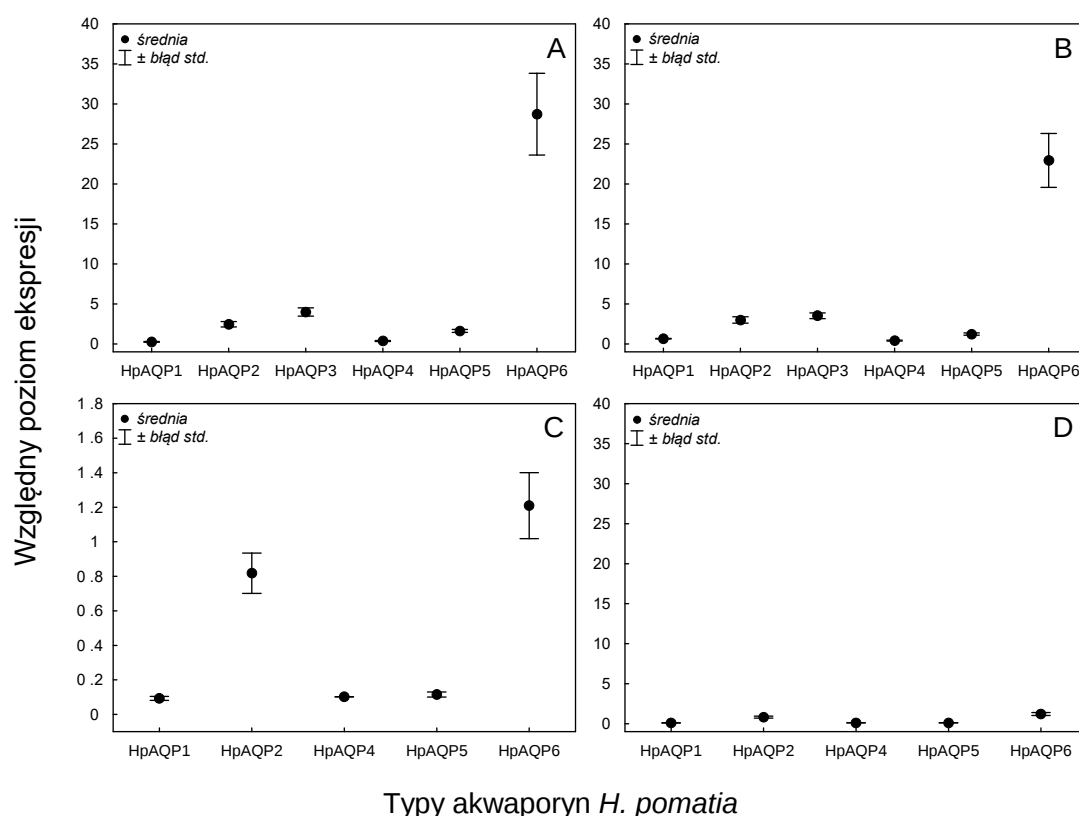
W celu wyznaczenia profilu organo-specyficznej ekspresji genów akwaporyn *H. pomatia*, wyizolowano całkowite RNA z różnych jego narządów (tj. z płaszcza, nogi, ślinianek, żołądka, jelita tylnego, wątrobotrzustki, zwojów mózgowych, płuca, nerki i gruczołu obojnaczego), przepisano na komplementarny DNA (cDNA) i przeprowadzono reakcję PCR (Metody, 4.4.1). Otrzymane wyniki przedstawiono na Ryc. 13. Na ich podstawie stwierdzono, że transkrypty genów kodujących HpAQP1, HpAQP2 i HpAQP5 występują w komórkach wszystkich przebadanych narządów, co jest typowe dla białek należących do akwaporyn typu AQP1 (Wstęp, 1.4.1). Natomiast transkryptów pozostałych genów nie stwierdzono we wszystkich badanych organach. Transkryptów genu kodującego HpAQP3 nie stwierdzono w komórkach żołądka, jelita tylnego, zwojów mózgowych i płuca, podczas gdy transkryptów genu kodującego HpAQP4 nie zaobserwowano w gruczole obojńczym, a HpAQP6 w tym samym gruczole i dodatkowo w komórkach ślinianek.



Ryc. 13. Profil organo-specyficznej ekspresji genów akwaporyn ślimaka winniczna *H. pomatia*. MM – Marker Mas 100bp DNA Ladder Plus, 1 – płaszcz, 2 – noga, 3 – ślinianki, 4 – żołądek, 5 – jelito tylne, 6 – wątrobotrzustka, 7 – zwoje mózgowce, 8 – płuco, 9 – nerka, 10 – gruczoł obojnaczy, K – reakcja kontrolna, w której matrycę DNA zastąpiono wodą

W następnym etapie badań stosując metodę Real-time PCR sprawdzono, jaki jest względny poziom ekspresji genów kodujących akwaporyny w trzech narządach – jelicie, nerce oraz nodze (Metody, 4.4.4). Narządy te wybrano ze względu na ich znaczenie w zachowaniu homeostazy wodnej całego organizmu. W jelicie najwyższy poziom ekspresji stwierdzono dla genów kodujących HpAQP2 oraz HpAQP6. Pozostałe trzy transkrypty wykazywały niższy poziom ekspresji. W nerce i nodze również stwierdzono, że najwyższym poziomem ekspresji cechuje się transkrypt kodujący HpAQP6. W obu tych narządach transkrypt *HpAQP3* wykazywał poziom ekspresji niższy od *HpAQP6* ale wyższy od pozostałych akwaporyn. Pozostałe akwaporyny wykazywały najniższy poziom ekspresji.

Ponadto, porównując ekspresję poszczególnych genów w nodze, nerce oraz jelicie można zauważyć, że wszystkie ulegały ekspresji na tym samym poziomie zarówno w nodze, jak i w nerce. Wyjątek stanowił gen *HpAQP1*, który w nodze ulegał wyższej ekspresji niż w nerce (Ryc. 7Z). W jelicie natomiast, ilość transkryptów dla wszystkich akwaporyn była znacząco niższa niż w dwóch pozostałych tkankach (Ryc. 14 oraz załącznik Tab. 1Z-6Z, Ryc. 7Z-12Z).



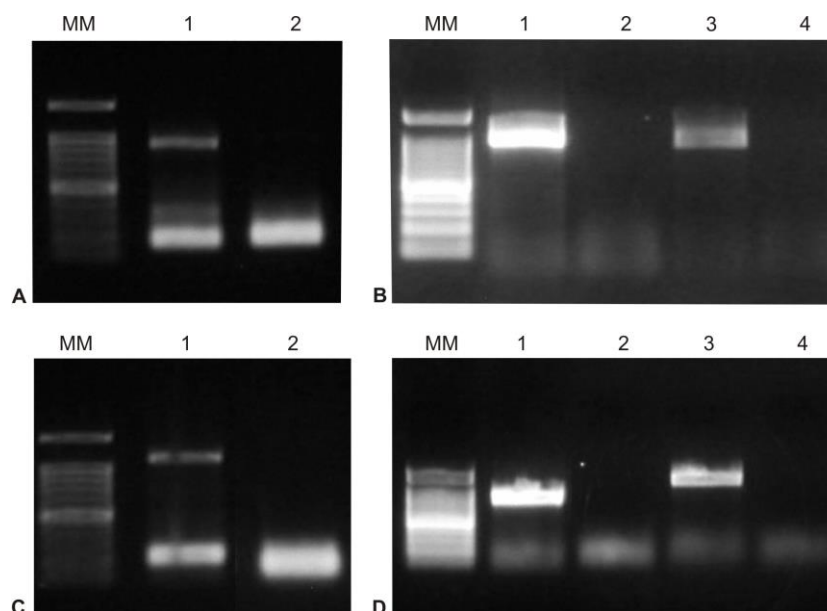
Ryc. 14. Względny poziom ekspresji genów kodujących akwaporyny w nerce (A) nodze (B) oraz w jelicie (C) przyrównany do tej samej skali. D Względny poziom ekspresji genów kodujących akwaporyny w jelicie przedstawiony w mniejszej skali w celu zobrazowania różnic w ilościach poszczególnych transkryptów

5.4. Określenie funkcjonalności przewidywanych białek HpAQP w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

Analiza bioinformatyczna przewidywanych sekwencji aminokwasowych HpAQP1-6 wykazała, że białka te mogą być funkcjonalnymi akwaporynami, różniącymi się selektywnością prowadzonego transportu. W celu eksperymentalnego potwierdzenia tego założenia HpAQP1-6 poddano heterologicznej ekspresji w komórkach szczepu drożdży *S. cerevisiae* pozbawionego funkcjonalnych akwaporyn, co umożliwiło przeprowadzenie tzw. testów komplementacji.

5.4.1. Otrzymanie konstruktów HpAQP1-6 do transformacji komórek drożdży *S. cerevisiae*

Otrzymanie konstruktów, czyli wektora pYX142 z insertem w postaci sekwencji kodującej poszczególne białka HpAQP, rozpoczęto od namnożenia tych sekwencji za pomocą metody „touch up” PCR (Metody, 4.4.3). Umożliwiła ona, w oparciu o zastosowane startery, wprowadzenie na końce 5' i 3' poszczególnych insertów sekwencji rozpoznawane przez odpowiednie enzymy restrykcyjne (Metody, 4.7.2.1).



Ryc. 15. Wynik rozdziału elektroforetycznego na 1% żelu agarozowym produktów reakcji PCR „touch up”. (A) MM – marker mas, linia 1 – produkt reakcji dla HpAQP1; linia 2 – reakcja kontrolna. (B) linie 1 i 3 – produkty reakcji dla HpAQP2 i HpAQP3; linie 2 i 4 – reakcje kontrolne. (C) linia 1 – produkt reakcji dla HpAQP4; linia 2 – reakcja kontrolna. (D) linie 1 i 3 – produkt reakcji dla HpAQP5 i HpAQP6; linie 2 i 4 – reakcje kontrolne

Otrzymane produkty reakcji PCR, podobnie jak wektor pYX142, zostały następnie poddane działaniu enzymów restrykcyjnych (Metody, 4.7.2.1) oraz oczyszczone na kolumnkach (Metody, 4.6.2). W kolejnym etapie każdy insert włączono do wektora pYX142, dzięki zastosowaniu ligazy T4 (Metody, 4.7.2.2) i tak przygotowanymi konstruktami transformowano komórki bakterii *E. coli* (Metody, 4.7.2.3). Następnie, po namnożeniu komórek bakterii, izolowano z nich poszczególne konstrukty (Metody, 4.8). W tabeli 4 (Tab. 4) zebrano informacje dotyczące stężenia otrzymanych konstruktów. Konstrukty te wykorzystano następnie do transformacji komórek mutantu Δ fps1 *S. cerevisiae* (Metody, 4.9).

Tab. 4. Stężenie wyizolowanych konstruktów zawierających sekwencje kodujące przewidywane akwaporyny *H. pomatia*

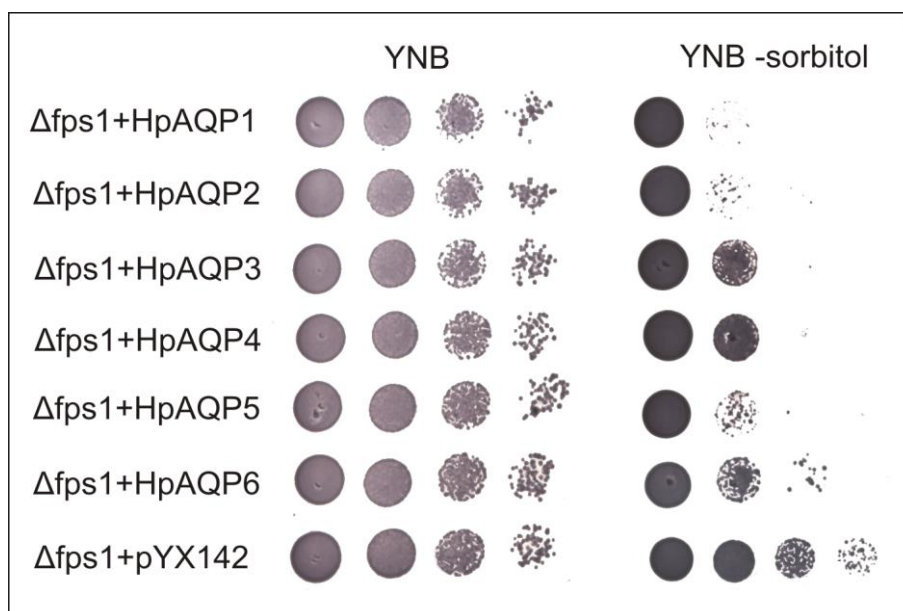
Plazmid	Stężenie (µg/µl)
pYX142+HpAQP1	4,1 µg/µl
pYX142+HpAQP2	4,2 µg/µl
pYX142+HpAQP3	4,4 µg/µl
pYX142+HpAQP4	4,4 µg/µl
pYX142+HpAQP5	3,5 µg/µl
pYX142+HpAQP6	3,3 µg/µl
pYX142	1,5 µg/µl

5.4.2. Zdolności transportowe HpAQP1-6 określone na podstawie testów komplementacji przeprowadzonych w komórkach drożdży *S. cerevisiae*

W celu sprawdzenia, czy przewidywane sekwencje aminokwasowe akwaporyn *H. pomatia* tworzą w błonach biologicznych funkcjonalne kanały wodne wykorzystano komórki mutantu Δ fps1 drożdży *S. cerevisiae* (Materiały, 3.1.3). Mutant ten pozbawiony jest genu *fps1* kodującego akwagliceroporynę oraz posiada dwie niefunkcjonalne akwaporyny, co sprawia, że jest on bardziej odporny na zmiany osmotyczności pożywki niż szczep zawierający funkcjonalne akwaporyny. Wprowadzenie do takich komórek wektora z sekwencją kodującą funkcjonalną akwaporynę umożliwia odtworzenie fenotypu charakterystycznego dla szczepu dzikiego, to jest przywraca wrażliwość komórek na zmiany osmotyczności środowiska. Możliwe staje się również sprawdzenie czy wbudowana w błony akwaporyna oprócz wody transportuje także inne związki, takie jak nadletenek wodoru czy glicerol (Li i Wang 2017). Po transformacji

i selekcji transformantów (Metody, 4.9), przeprowadzono testy komplementacji umożliwiające oszacowanie czy białka HpAQP1-6 transportują wodę, nadtlenek wodoru oraz glicerol.

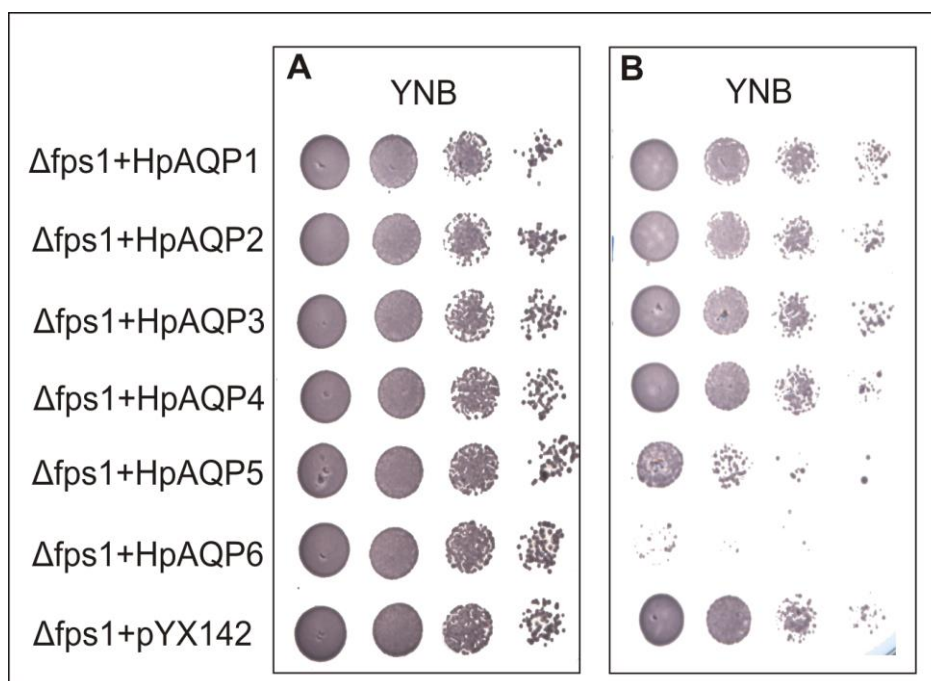
Aby zweryfikować możliwość transportu wody przez te białka, komórki hodowano w izoosmotycznej płynnej pożywce selekcyjnej YNB (Materiały, 4.10.1), po czym nakraplano je na stałą pożywkę selekcyjną YNB izoosmotyczną (zawierająca 1 M sorbitol) lub hipoosmotyczną (bez sorbitolu), stosując serię rozcieńczeń (Metody, 4.10.1). Jak pokazano na Ryc. 16, na pożywce izoosmotycznej nie zaobserwowano różnic we wzroście pomiędzy komórkami transformowanymi *HpAQP1-6* a komórkami mutanta Δ fps1 transformowanymi pustym wektorem (kontrola). Natomiast na pożywce hipoosmotycznej różnice we wzroście były wyraźne. O ile wzrost komórek zawierających pusty wektor (Δ fps1+pYX142) nie różnił się od obserwowanego na pożywce izoosmotycznej, o tyle wzrost transformantów Δ fps1+HpAQP1 – Δ fps1+HpAQP6 był znacznie obniżony. Najsilniejszy efekt obserwowano dla komórek z ekspresją HpAQP1, HpAQP2 i HpAQP5, słabszy w przypadku HpAQP6, a najslabszy dla komórek z ekspresją HpAQP3 i HpAQP4. Wynik ten sugeruje, że białka HpAQP1, HpAQP2 i HpAQP5 transportują wodę wydajniej niż białko HpAQP6 i dużo wydajniej niż HpAQP3 i HpAQP4.



Ryc. 16. Wpływ osmotyczności pożywki na wzrost komórek transformantów Δ fps1+HpAQP1-6 oraz Δ fps1+pYX142 (kontrola). Komórki nakraplano na pożywkę izoosmotyczną (YNB) i hipoosmotyczną (YNB –sorbitol) w serii dziesięciokrotnych rozcieńczeń (1, 1:10, 1:100, 1:1000) i hodowano w 28°C przez 4 dni. Eksperyment przeprowadzono w trzech powtórzeniach biologicznych

Nadtlenek wodoru jest związkiem pełniącym wiele funkcji związanych z przekazywaniem sygnałów, wzrostem czy programowaną śmiercią komórki. Ponadto, u Mollusca potwierdzono znaczenie nadtlenu wodoru jako elementu obronnego w odpowiedzi immunologicznej przeciw pasożytom (Bender i in. 2005). Co ciekawe, dane literaturowe wskazują, że niektóre akwaporyny posiadają zdolność transportu tego związku (Bienert i Chaumont 2014). Z tego względu zdecydowano się sprawdzić, czy potencjalne akwaporyny *H. pomatia* również mogą prowadzić jego transport. W tym celu, przeprowadzono kolejny test komplementacji, w którym przed nakropieniem serii rozcieńczeń komórek na stałą izoosmotyczną pożywkę YNB, drożdże hodowano w analogicznej pożywce płynnej w obecności lub przy braku nadtlenu wodoru (Metody, 4.10.2).

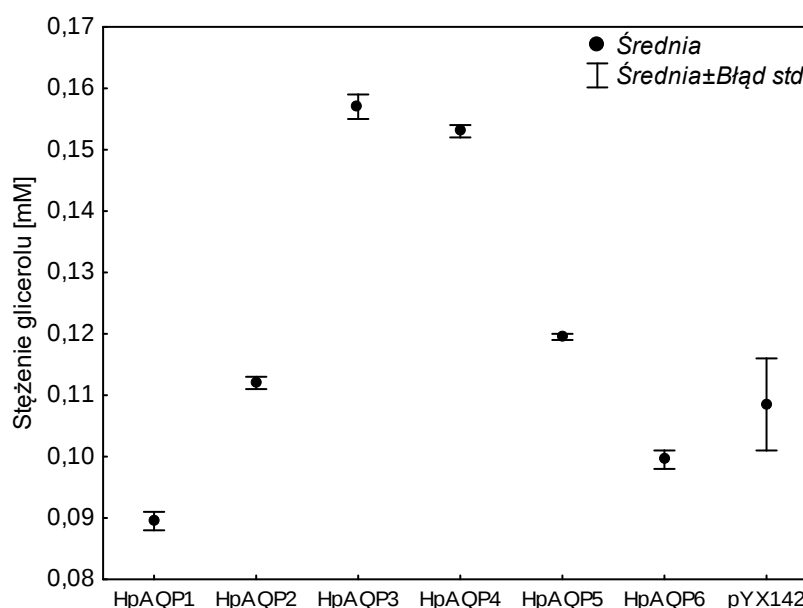
Jak pokazano na Ryc. 17, komórki wykazujące się ekspresją *HpAQP1-4* i mutant $\Delta fps1$ z pustym wektorem (kontrola) nie wykazują różnic we wzroście w obecności, i przy braku nadtlenu wodoru. Natomiast wzrost komórek z ekspresją *HpAQP5* i *HpAQP6* ulega wyraźnemu upośledzeniu po zastosowaniu nadtlenu wodoru. Tym samym można wnioskować że *HpAQP5* i *HpAQP6* posiadają zdolność transportu nadtlenu wodoru, przy czym wydajność tego transportu jest znacznie wyższa dla *HpAQP6*.



Ryc. 17. Wpływ nadtlenu wodoru na wzrost komórek transformantów $\Delta fps1+HpAQP1-6$ oraz $\Delta fps1+pYX142$ (kontrola). Dziesiętne rozcieńczenia płynnej kultury drożdżowej (1, 1:10, 1:100, 1:1000) prowadzonej na pożywce YNB bez dodanego nadtlenu wodoru (A) lub z dodanym nadtlenkiem wodoru o końcowym stężeniu 2,5mM (B) nakraplano na pożywkę izoosmotyczną (YNB) i hodowano w 28°C przez 4 dni. Eksperyment przeprowadzono w trzech powtórzeniach biologicznych

Struktura regionów ar/R należących do zidentyfikowanych białek, wstępnie wskazała, że białka HpAQP3 i HpAQP4 powinny wykazywać zdolność transportu glicerolu. HpAQP1 oraz HpAQP5 posiadają filtr selektywności wykluczający możliwość transportu tego związku, natomiast skład aminokwasowy regionów ar/R należących do HpAQP2 oraz HpAQP6 uniemożliwiał wstępne wnioskowanie na temat możliwości transportu glicerolu przez te białka.

W celu weryfikacji możliwości transportu glicerolu przez HpAQP1-HpAQP6 przeprowadzono test komplementacji, oparty na założeniu, że komórki posiadające funkcjonalne akwagliceroporyny będą uwalniały do pożywki więcej glicerolu w porównaniu z komórkami nie posiadającymi białek o takiej aktywności (Luyten i in. 1995). Stężenie glicerolu w pożywkach pohodowlanych, uzyskanych po oddzieleniu komórek, określano przy użyciu „Glycerol assay kit” (Metody, 4.10.3). Wyznaczone wartości przedstawiono na Ryc. 18.



Ryc. 18. Stężenie glicerolu w pożywce pohodowlanej, uzyskanej po oddzieleniu komórek drożdży *S. cerevisiae* z ekspresją HpAQP1-6 i z pustym wektorem pYX142 (pYX142)

Jak pokazano na Ryc. 18, w pożywkach pohodowlanych uzyskanych po oddzieleniu komórek z ekspresją HpAQP1, HpAQP2, HpAQP5 i HpAQP6 i pustym wektorem (kontrola) nie występują różnice w stężeniu glicerolu (Tab. 7Z). Natomiast w pożywkach pohodowlanych uzyskanych po oddzieleniu komórek z ekspresją HpAQP3 i HpAQP4 stężenie glicerolu różni się statystycznie od stężenia glicerolu w pożywce pohodowlanej uzyskanej po oddzieleniu komórek mutantu Δ fps1. Tym

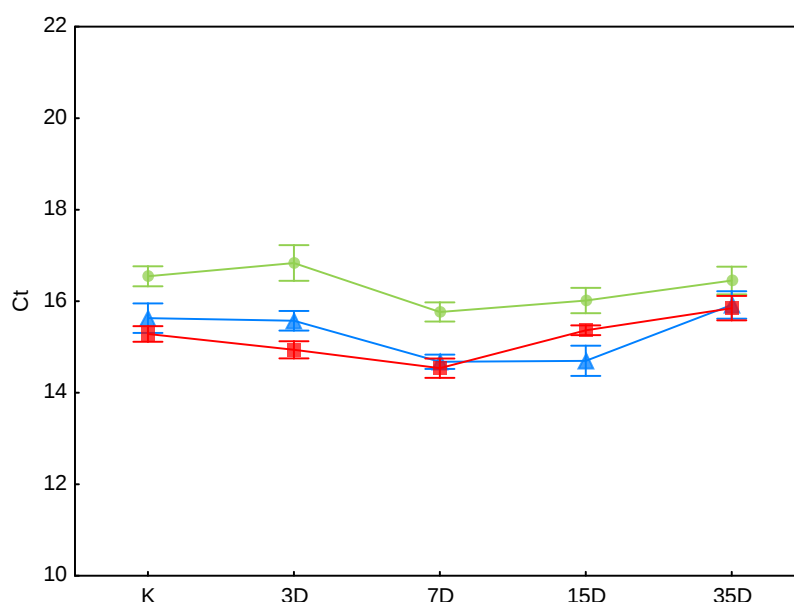
samym można wnioskować, że HpAQP3 i HpAQP4 – w odróżnieniu od HpAQP1, HpAQP2, HpAQP5 i HpAQP6 – posiadają zdolność transportu glicerolu.

5.5. Weryfikacja fizjologicznej roli zidentyfikowanych białek

5.5.1. Opracowanie warunków eksperymentu metodą PCR w czasie rzeczywistym

Przeprowadzenie reakcji PCR w czasie rzeczywistym wymagało zaprojektowania odpowiednich starterów oraz wyznaczenia genu referencyjnego. Wszystkie startery wykorzystane do tej reakcji charakteryzowały się wydajnością, określoną na podstawie krzywej wzorcowej, rzędu 90-100%. Ponadto, wyznaczona krzywa topnienia wskazywała na powstawanie pojedynczych, specyficznych dla każdej pary starterów produktów, bez tworzenia struktur typu primer-dimer.

W celu znalezienia genu referencyjnego przetestowano poziom ekspresji trzech transkryptów – 18SrRNA, GAPDH (dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego) oraz α EF1 (czynn timer elongacyjny). Pierwsze dwa wykazywały jednak zbyt duże różnice w poziomie ekspresji, w związku z tym musiały zostać odrzucone jako geny referencyjne. Natomiast gen α EF1 charakteryzował się najbardziej równym poziomem ekspresji we wszystkich badanych tkankach zarówno w kontroli, jak i w trakcie zapadania ślimaka w stan estywacji (Ryc. 19).



Ryc. 19. Średnie wartości Ct dla genu referencyjnego α EF1. Pomiary wykonane na cDNA uzyskanym z jelita oznaczono kolorem niebieskim, z nogi - zielonym, a z nerki - czerwonym

5.5.2. Wyznaczenie zmian poziomu ekspresji genów kodujących akwaporyny w trakcie zapadania ślimaka w stan estywacji

Estywacja to proces ograniczenia aktywności oraz spowolnienia metabolizmu wywołany niesprzyjającymi warunkami środowiska. Ponieważ jest on ściśle powiązany ze spadkiem wilgotności powietrza, ślimak musi dostosować swoją gospodarkę wodną do pojawiających się zmian. Akwaporyny, jako białka budujące kanały wodne, powinny w tym procesie brać udział. W celu zweryfikowania tego założenia wykonano eksperyment, w którym sprawdzono, jak zmienia się poziom ekspresji genów akwaporyn w nodze, nerce oraz jelicie w trakcie zapadania w stan estywacji (3, 7, 15 dni bez wody) oraz u ślimaka estywującego (35 dni bez wody) (Materiały, 3.1.1). Wyniki analizy statystycznej oraz wykresy obrazujące zmiany w poziomie ekspresji poszczególnych genów znajdują się w Załączniku (Tab.8Z-13Z oraz Ryc. 13Z-18Z).

Poziom ekspresji *HpAQP1* nie ulega zmianie w jelicie, natomiast spada w nerce i w nodze. Różny jest jednak moment zachodzenia tych zmian, gdyż w nerce obniżenie ilości transkryptu występowało dopiero w 35 dniu, natomiast w nodze zmiana ta zauważalna była już od 3 dnia eksperymentu (Tab. 8Z i Ryc. 13Z).

Zmiany zachodzące w ekspresji *HpAQP2* w jelicie i w nodze są takie same – dochodziło do spadku w 3 dniu zapadania w stan estywacji, po czym ilość transkryptu wracała do poziomu wyjściowego, takiego jak w kontroli. W nerce miała miejsce większa liczba zmian. Po spadku poziomu ekspresji w 3 dniu, w 7 dniu jej wartość wzrastała do poziomu kontroli, żeby w dniu 15 z powrotem spaść do poziomu z dnia 3 i taki stan utrzymywał się aż do 35 dnia (Tab. 9Z i Ryc. 14Z).

Ilość transkryptu *HpAQP3* w nerce spadała w 3 dniu, następnie wzrastała do poziomu kontrolnego i utrzymywała się aż do 35 dnia na tym poziomie. W nodze natomiast poziom ekspresji nie zmieniał się aż do 35 dni, w którym dochodziło do jego wzrostu. W jelicie natomiast nie dochodzi do ekspresji tego genu (Tab. 10Z i Ryc. 15Z).

Poziom ekspresji *HpAQP4* spadał w jelicie i w nodze już od 3 dnia, przy czym w jelicie efekt ten utrzymywał się przez cały czas, natomiast w nodze w 15 dniu zapadania w stan estywacji wracał do poziomu kontroli. W nerce natomiast poziom ekspresji tego genu wzrastał w 7 dniu, efekt utrzymywał się do dnia 15, po czym u estywującego ślimaka powracał do poziomu kontroli (Tab. 11Z i Ryc. 16Z).

Gen *HpAQP5* w jelicie ulegał ekspresji na niezmiennym poziomie w trakcie zapadania ślimaka w stan estywacji. W nerce w 15 dniu wzrastał poziom ekspresji *HpAQP5*, po czym powracał do stanu wyjściowego, natomiast w nodze spadał w 3 dniu, po czym wzrastał, lecz wciąż był niższy niż w kontroli (Tab. 12Z i Ryc. 17Z).

Zmiany w poziomie ekspresji *HpAQP6* zauważalne były we wszystkich trzech tkankach. W jelicie w 7 dniu dochodziło do spadku ilości transkryptu, po czym

w 35 dniu jego ilość wracała do poziomu kontroli. W nerce od 3 dnia zaobserwowano obniżenie poziomu ekspresji genu w stosunku do kontroli o 98%. Była to największa zmiana w poziomie ekspresji zaobserwowana spośród wszystkich przebadanych transkryptów we wszystkich trzech tkankach. W nodze natomiast wykazano wzrost poziomu ekspresji *HpAQP6* w 35 dniu (Tab. 13Z i Ryc. 18Z).

Tab. 5. Macierz zmiany poziomu ekspresji genów kodujących akwaporyny w trakcie zapadania ślimaka w stan estywacji, w czterech grupach eksperymentalnych i jednej grupie kontrolnej. K – kontrola, 3D, 7D, 15D i 35D – odpowiednio trzy, siedem, piętnaście i trzydzieści pięć dni bez podawania pokarmu oraz zraszania. Liczby w tabeli przedstawiają procentową różnicę w poziomie ekspresji genów. Kolor zielony oznacza istotny statystycznie wzrost poziomu ekspresji genu, kolor czerwony jego spadek. Statystyczne testy dla średnich różnic przedstawiono w Załączniku (Tab.8Z-13Z)

		Jelito					Nerka					Noga				
		K	3D	7D	15D	35D	K	3D	7D	15D	35D	K	3D	7D	15D	35D
AQP1	K	-					-					-				
	3D	0,92	-				0,59	-				0,42	-			
	7D	0,65	0,71	-			0,68	1,15	-			0,45	1,08	-		
	15D	0,73	0,80	1,13	-		0,69	1,16	1,02	-		0,86	2,04	1,88	-	
	35D	1,10	1,19	1,69	1,50	-	0,36	0,60	0,53	0,52	-	0,47	1,13	1,04	0,55	-
AQP2	K	-					-					-				
	3D	0,20	-				0,07	-				0,21	-			
	7D	0,48	2,39	-			1,01	15,26	-			0,54	2,59	-		
	15D	0,45	2,25	0,94	-		0,28	4,27	0,28	-		0,47	2,27	0,88	-	
	35D	0,83	4,10	1,72	1,82	-	0,12	1,78	0,12	0,42	-	0,69	3,30	1,28	1,46	-
AQP3	K	-					-					-				
	3D	-	-				0,25	-				1,16	-			
	7D			-			0,99	3,99	-			0,97	0,83	-		
	15D				-		0,73	2,96	0,74	-		1,92	1,65	1,98	-	
	35D					-	0,66	2,65	0,66	0,90	-	3,83	3,29	3,94	2,00	-
AQP4	K	-					-					-				
	3D	0,31	-				1,44	-				0,30	-			
	7D	0,29	0,91	-			10,88	7,57	-			0,18	0,60	-		
	15D	0,26	0,84	0,92	-		3,54	2,47	0,33	-		0,71	2,34	3,89	-	
	35D	0,24	0,76	0,83	0,90	-	2,02	1,41	0,19	0,57	-	0,91	3,01	5,01	1,29	-
AQP5	K	-					-					-				
	3D	0,81	-				0,66	-				0,13	-			
	7D	0,84	1,04	-			0,81	1,22	-			0,46	3,58	-		
	15D	1,04	1,28	1,23	-		1,33	2,01	1,64	-		0,54	4,21	1,18	-	
	35D	1,41	1,75	1,68	1,36	-	0,84	1,28	1,04	0,64	-	0,36	2,80	0,78	0,66	-
AQP6	K	-					-					-				
	3D	0,77	-				0,02	-				1,03	-			
	7D	0,22	0,29	-			0,01	0,57	-			0,21	0,21	-		
	15D	0,16	0,20	0,70	-		0,01	0,60	1,05	-		0,61	0,59	2,86	-	
	35D	0,45	0,59	2,03	2,91	-	0,01	0,80	1,41	1,34	-	2,45	2,37	11,45	4,00	-

6. DYSKUSJA

Dla prawidłowego funkcjonowania komórek konieczny jest stan homeostazy wodnej. W utrzymanie tego stanu zaangażowane są bezpośrednio akwaporyny, czyli białka budujące w błonach kanały wodne (Takata i in. 2004). W konsekwencji, akwaporyny pełnią kluczową rolę w wielu procesach fizjologicznych. Na przykład u roślin akwaporyny, lokalizowane w komórkach korzenia, łodygi, liści, kwiatów i nasion, jak również zaangażowane są w transport symplastowy i apoplastowy (Azad i in. 2016). U zwierząt natomiast występują w komórkach układu oddechowego, wydalniczego, nerwowego, rozrodczego, pokarmowego i krwionośnego, gdzie regulują przepływ przez błonę wody, glicerolu i innych związków niskocząsteczkowych, zapewniając prawidłowe funkcjonowanie całego organizmu (Takata i in. 2004). Występowanie akwaporyn potwierdzono także w przypadku archeonów i bakterii (Abascal i in. 2014; Hofmann i in. 2000; Kozono i in. 2003). Zatem, zaskakuje fakt, że po ponad 25 latach, które upłynęły od odkrycia akwaporyn, istnieją nieliczne opracowania na ich temat u tak dużej grupy zwierząt, jaką stanowią mięczaki (Abascal i in. 2014; Pieńkowska i in. 2014; Colgan i Santos 2018). Uzyskane w niniejszej pracy wyniki stanowią właściwie pierwsze, szczegółowe opracowanie dotyczące akwaporyn u przedstawiciela tej grupy zwierząt – ślimaka winniczka *Helix pomatia*, uznawanego za model w badaniach ślimaków lądowych. W opracowaniu tym wykorzystano szeroką gamę metod, od bioinformatycznej analizy transkryptomu i przewidywanych sekwencji aminokwasowych, po testy komplementacji wykonywane w odpowiednich mutantach *Saccharomyces cerevisiae*.

Struktura przestrzenna akwaporyn stwierdzona metodami krystalograficznymi została dotychczas opracowana dla dwunastu białek². Jej analiza, wraz z danymi uzyskanymi w badaniach mutantów wykazała, że za selektywność transportu prowadzonego przez te białka odpowiedzialne są dwa motywy NPA oraz region ar/R. Dzięki wykorzystaniu metod bioinformatycznych (Wyniki, 5.2.2 i 5.2.4) możliwość tworzenia takich elementów strukturalnych stwierdzono dla sześciu sekwencji aminokwasowych *H. pomatia*, które oznaczono symbolami HpAQP1-HpAQP6.

² AQP0 (PDB: 2B60), AQP1 (1J4N), AQP2 (4NEF), AQP4 (3GD8), AQP5 (3D9S), AqpZ (1RC2), GlpF (1FX8), SoPIP2;1 (1Z98), Aqp1 (2W1P), AqpM (2F2B), PfAQP (3C02) oraz AtTIP2;1 (5I32) (Gonen i in. 2006; Sui i in. 2001; Frick i in. 2014; Ho i in. 2009; Horsefield i in. 2008; Savage i in. 2003; Fu i in. 2000; Törnroth-Horsefield i in. 2006; Fischer i in. 2009; Lee i in. 2005; Newby i in. 2008; Kirscht i in. 2016).

Motywy NPA (asparagina-prolina-alanina) uznaje się za najbardziej charakterystyczne dla akwaporyn, przy czym w ich obrębie mogą występować podstawienia innymi aminokwasami (Ishibashi 2006). Najczęściej podstawienie dotyczy trzeciej pozycji w motywie, czyli alaniny. W bazie MIPModDB zdeponowanych jest obecnie 1507 sekwencji akwaporyn. Jak wykazała analiza, przeprowadzona na potrzeby niniejszej pracy, wśród tych sekwencji 21% zawiera w trzeciej pozycji motywu NPA inny aminokwas niż alanina (najczęściej są to seryna, treonina, walina, cysteina bądź glicyna). Prolina w drugiej pozycji motywu NPA jest aminokwasem, który rzadziej ulega podstawieniu, bowiem tylko u 12% białek zdeponowanych w bazie MIPModDB zaobserwowano podstawienie, najczęściej leucyną, alaniną, treoniną lub seryną. Najrzadziej podstawieniu ulega asparagina, ponieważ tylko 3% spośród sekwencji białek w bazie MIPModDB nie posiada tego aminokwasu w pierwszej pozycji motywu NPA. Wtedy najczęściej na jej miejscu występują seryna, histydyna bądź cysteina. Dostępne dane wskazują, że brak asparaginy w tej pozycji może prowadzić do transportu jonów Na^+ przez kanał (Wree i in. 2010). Ponieważ utrzymanie gradientu jonów Na^+ w poprzek błony komórkowej jest niezbędne do utrzymania jej potencjału, niekontrolowany przepływ jonów Na^+ jest niewskazany i energetycznie kosztowny. Co więcej, o ile w akwaporynach człowieka podstawienia w obrębie motywów NPA są bardzo rzadkie (Wstęp, 1.4.4), o tyle u bezkręgowców takie podstawienia występują częściej. Na przykład, u *D. melanogaster*, *A. aegypti*, *Bemisia tabaci*, *Cimex lectularius* oraz *Lygus hesperus* zidentyfikowano grupę białek, które zamiast pierwszego motywu NPA posiadają bardzo rzadki motyw CPY (cysteina-prolina-tyrozyna) (Fabrick i in. 2014). Ponadto, często występują podstawienia w trzeciej pozycji obu motywów NPA (Kaufmann i in. 2005; Drake i in. 2005; Van Ekert i in. 2016). Warto także zauważyć, że podstawienie trzeciego aminokwasu występujące w pierwszym motywie NPA jest charakterystyczne tylko dla białek należących do grupy Eglp (Finn i in. 2015b). W przypadku sześciu akwaporyn postulowanych dla *H. pomatia*, trzy białka posiadają niezmiennione oba motywy NPA (HpAQP1, HpAQP2 i HpAQP6). Natomiast u trzech pozostałych stwierdzono podstawienia w trzeciej pozycji zarówno w pierwszym motywie NPA (na cysteinę w HpAQP3 oraz walinę w HpAQP4), jak i w drugim motywie NPA (na serynę w HpAQP5) (Tab.3). Biorąc pod uwagę dostępne dane (Wree i in. 2011), podstawienia te nie eliminują tych białek z grupy akwaporyn. Co więcej, podstawienia występujące w przypadku HpAQP3 i HpAQP4 sugerują, że białka te, podobnie jak niektóre akwaporyny owadów, mogą transportować glicerol (Jing i in. 2016), natomiast cztery pozostałe prawdopodobnie nie.

Drugim elementem strukturalnym odpowiedzialnym za selektywność transportu akwaporyn jest region ar/R (Sui i in. 2001). Jak wspomniano we Wstępie (Wstęp, 1.3),

region ar/R zbudowany jest z czterech aminokwasów, które tworzą największe miejsce kanału. Wielkość i polarność tych aminokwasów decyduje o rodzaju transportowanych przez kanał związków (Beitz i in. 2006), przy czym różnorodność budujących region ar/R aminokwasów jest bardzo duża. Wśród zdeponowanych w bazie MIPModDB białek wyróżniono 200 różnych kombinacji (Gupta i in. 2012). Najczęściej występują kombinacje FHTR³ oraz WGYR³, które są typowe dla odpowiednio akwaporyn grupy typu AQP1 oraz AQP3 (Gupta i in. 2012). Dla akwaporyn *H. pomatia* nie stwierdzono jednak regionu ar/R o takim składzie. Co więcej, jak pokazano w Wynikach (Wyniki, 5.2.2), dla dwu z analizowanych akwaporyn uzyskano region ar/R o składzie aminokwasowym nie opisanym dotychczas w bazie MIPModDB. W HpAQP2 region ten zbudowany jest z fenyloalaniny, glutaminy, alaniny oraz argininy (FQAR). Glutamina jest jednym z najrzadziej występujących aminokwasów w obrębie tego regionu, jednak polarność jej łańcucha bocznego jest podobna do występującej często w tym miejscu w akwaporynach grupy typu AQP1, histydyny (Verma i in. 2015). Tym samym można przypuszczać, że podobnie jak HpAQP1 (FHAR³) i HpAQP5 (FHSR³), HpAQP2 należy do grupy akwaporyn transportujących wodę, lecz nie transportujących glicerolu. Natomiast w HpAQP6 region ar/R zbudowany jest z cysteiny, izoleucyny, alaniny oraz argininy (CIAR). Co zaskakujące, w kombinacji tej nie występuje aminokwas aromatyczny, który jest cechą charakterystyczną tego regionu (Verma i in. 2015). Jednak akwaporyny o podobnym składzie regionu ar/R zidentyfikowano wśród innych mięczaków – jedną u ślimaka morskiego *L. gigantea* (seryna, izoleucyna, alanina i arginina – SIAR) i dwie u małża *C. gigas* (treonina, walina, glicyna i arginina - TVGR oraz alanina, izoleucyna, glicyna i arginina - AIGR) (Wyniki, 5.2.6). Ponadto, jak wspomniano we Wstępie (Wstęp, 1.3), białka z rodziny NIP oraz nowo zidentyfikowanej grupy Aqp14 również nie posiadają w regionie ar/R aminokwasu aromatycznego (Finn i in. 2014; Mitani-Ueno i in. 2011). Jego brak powoduje zwiększenie średnicy kanału, co prawdopodobnie umożliwia transport innych cząsteczek, a nie tylko wody. Można więc założyć, że białko HpAQP6 tworzy kanał transportujący również glicerol. W przypadku HpAQP3 (FIGR) oraz HpAQP4 (FSCR) regiony ar/R odpowiadają składem aminokwasowym regionom ar/R opisanym dla akwaporyn grupy typu AQP3 (Gupta i in. 2012). Tym samym, podobnie jak HpAQP6, HPAQP3 i HpAQP4 prawdopodobnie transportują zarówno wodę, jak i glicerol.

³ FHAR - fenyloalanina, histydyna, alanina, arginina; FHSR - fenyloalanina, histydyna, seryna, arginina; FHTR - fenyloalanina, histydyna, treonina, arginina; WGYR – tryptofan, glicyna, tyrozyna, arginina

Akwaporyny, tak samo jak inne białka, ulegają modyfikacjom potranslacyjnym, takim jak fosforylacja czy glikozylacja (Li i Wang 2017). Są one istotne dla ich sortowania, stabilności, interakcji z innymi białkami oraz aktywności. Ponadto, wykazano, że transport przez akwaporyny zależy od zmian pH, i stężenia jonów wapnia (Kaptan i in. 2015; Németh-Cahalan i in. 2004). Molekularny mechanizm działania różnych modyfikacji i warunków komórkowych na akwaporyny został rozpoznany tylko dla kilku białek. Jak wspomniano w Wynikach (Wyniki, 5.2.5), w przypadku akwaporyn człowieka rozpoznano kilka miejsc fosforylacji, istotnych dla ich transportu do określonego przedziału komórkowego (AQP1, AQP2, AQP5, AQP8), jak i bramkowania tworzonych przez nie kanałów (AQP4) (Törnroth-Horsefield i in. 2010). Odpowiedniki niektórych fosforylowanych aminokwasów udało się zlokalizować również w akwaporynach *H. pomatia*. Dotychczas dokładnie opisane zmiany konformacyjne zależne od fosforylacji, a związane z bramkowaniem kanału opisano tylko dla Aqp1 drożdży, SoPIP2;1 szpinaku oraz AQP0 człowieka (Fischer i in. 2009; Reichow i Gonen 2008; Nyblom i in. 2009). Co ciekawe, dla każdej z tych akwaporyn inny fragment polipeptydu zaangażowany jest w mechanizm regulacji (Törnroth-Horsefield i in. 2010). W Aqp1 długi koniec N tworzy helikalną strukturę, która zamyka por od strony cytoplazmatycznej, w przypadku AQP0 funkcję tę pełni pętla B, natomiast w SoPIP2;1 pętla D wnika do środka poru ograniczając możliwość transportu wody. Zatem, prawdopodobnie oparty na fosforylacji mechanizm regulacji transportu powstał wielokrotnie w toku ewolucji i zapewne nie są to wszystkie możliwe metody zamykania poru (Törnroth-Horsefield i in. 2010). Być może bardzo długi koniec C w HpAQP6, podobnie jak koniec N Aqp1, uczestniczy w zamykaniu kanału.

We wszystkich HpAQP stwierdzono obecność reszty histydyny tuż przed pierwszym motywem NPA. Reszta ta w przypadku innych akwaporyn została uznana za miejsce, którego uprotonowanie zależy od pH cytoplazmy i które wpływa na transport wody przez kanał (Kaptan i in. 2015). Można zatem założyć, że w białkach HpAQP również występuje taki mechanizm regulacji transportu. Z kolei glikolizacja akwaporyn uczestniczy w regulacji ich stabilności, jak to stwierdzono dla stabilność AQP2 i AQP10 człowieka (Hendriks i in. 2004; Öberg i in. 2011). Zatem, w przypadku HpAQP3 i HpAQP5 (Wyniki 5.2.5), dla których stwierdzono możliwość glikozylacji w analogicznych miejscach, modyfikacja ta może pełnić taką samą rolę.

Podstawową funkcją fizjologiczną, jaką pełnią akwaporyny jest budowa kanałów, które transportują wodę przez nabłonki (Verkman 2006). Dlatego też białka te pełnią bardzo istotną rolę w procesach ściśle związanych z transportem wody, takich jak zagęszczanie moczu, czy wydzielanie śliny. Ponadto, zlokalizowano je w adipocytach czy hepatocytach, czyli komórkach budujących narządy, których funkcja

fizjologiczna nie jest ściśle związana z transportem wody, a z transportem glicerolu (Laforenza i in. 2016a). Udokumentowano również, że obecność akwaporyn w plemnikach wpływa na ich ruchliwość, a brak tych białek zmniejsza ich możliwość poruszania się (Laforenza i in. 2016b). Można więc stwierdzić, że białka te uczestniczą w ważnych procesach fizjologicznych, nie tylko związanych z utrzymywaniem homeostazy wodnej organizmu. Z tego powodu, wyznaczenie profilu organo-specyficznej ekspresji genów kodujących akwaporyny *H. pomatia* nie zostało ograniczone tylko do takich narządów jak ślinianki i nerki, ale zostało rozszerzone o inne elementy układu pokarmowego (żołądek, jelito tylne, wątrobotrzustka), jak również nerwowego (zwoje mózgowe), rozrodczego (gruczoł obojnaczy), oddechowego (płuco) oraz dodatkowo o nogę, płaszcz i płuco. We wszystkich przebadanych narządach stwierdzono obecność transkryptów więcej niż jednego genu kodującego akwaporyny, a w nerce nodze, wątrobotrzustce i płaszczu stwierdzono obecność transkryptów genów kodujących wszystkie przewidywane białka HpAQP. Co więcej, transkrypty genów *HpAQP1*, *HpAQP2* i *HpAQP5* zlokalizowano w każdym, badanym narządzie (Wyniki, 5.2). Sugeruje to ich przynależność do grupy typu AQP1, natomiast trzy pozostałe białka HpAQP, biorąc pod uwagę ich lokalizację (Wyniki, 5.3), można zaliczyć do grupy typu AQP3.

Występowanie wielu różnych akwaporyn w jednym organie jest wynikiem typowym i udokumentowanym zarówno dla kręgowców, jak i bezkręgowców (Spring i in. 2009; Takata i in. 2004). Wynika to prawdopodobnie z wielu funkcji, jakie mogą pełnić poszczególne akwaporyny. Różnią się one zarówno szybkością transportu wody, rodzajem transportowanych związków, jak i mechanizmami regulacji tego transportu (Kreida i Törnroth-Horsefield 2015). Wszystkie te cechy dają szeroki wachlarz możliwości kontroli przepływu różnych cząsteczek. Można również przypuszczać, że występowanie różnych akwaporyn w jednym narządzie może stanowić ewolucyjne zabezpieczenie przed ewentualną dysfunkcją któregoś z białek, tak by inne mogło przejąć jego funkcję.

Analiza bioinformatyczna zidentyfikowanych sekwencji mRNA wykazała, że kodowane przez nie białka HpAQP są potencjalnymi akwaporynami. Ponadto, dalsze badania struktury motywów NPA i regionu ar/R, za pomocą programu PoreWalker (Wyniki, 5.2.4) oraz lokalizacja transkryptów kodujących poszczególne akwaporyny w różnych narządach wskazały, że część z nich należy do białek grupy typu AQP1 (wysoce selektywnych w stosunku do wody), a część do grupy typu AQP3 (posiadających zdolność transportu glicerolu). W celu weryfikacji, że geny *HpAQP1-6* kodują białka funkcjonujące jako kanały wodne oraz potwierdzenia czy posiadają one

zdolność transportu dodatkowych związków, wykonano test komplementacji w komórkach drożdży *S. cerevisiae*.

Drożdże *S. cerevisiae* uznawane są za organizm modelowy i wykorzystywane są w badaniach wielu procesów, takich jak fałdowanie białek, sygnalizacja komórkowa, procesy metaboliczne, czy transport błonowy (Fields i Johnston 2005). Stanowią model w badaniach wielu chorób, takich jak nowotwory czy choroby neurodegeneracyjne (Greenfield i in. 1999; Hartwell 2002; Muchowski i in. 2002). Powszechność ich stosowania wynika z faktu, że ich hodowla jest stosunkowo prosta i mało kosztowna, komórki łatwo ulegają modyfikacjom genetycznym, a szybkość podziałów umożliwia uzyskanie dużych ilości materiału w krótkim czasie (Fields i Johnston 2005). Ponadto, w Europejskiej Bazie *Saccharomyces cerevisiae* do Badań Funkcjonalnych (EUROSCARF) dostępne są mutanty drożdżowe pozbawione pojedynczych genów. Z wyżej wymienionych powodów zdecydowano się wykorzystać ten model w badaniach nad funkcjonalnością i selektywnością białek HpAQP *H. pomatia*. Do tego celu wykorzystano szczep $\Delta fps1$ pozbawiony genu kodującego akwagliceroporynę oraz posiadający dwie niefunkcjonalne akwaporyny (Wyniki 5.4.2). Badania z wykorzystaniem tego modelu wykazały, że wszystkie geny HpAQP kodują białka funkcjonujące jako kanały wodne. Nie wszystkie jednak transportują wodę z taką samą wydajnością. Jest ona wyższa dla białek HpAQP1, HpAQP2 oraz HpAQP5. Po raz kolejny wskazuje to na prawdopodobną przynależność tych białek do grupy typu AQP1. Natomiast białka należące do grupy typu AQP3 charakteryzują się mniejszą wydajnością transportu wody. Jak można zauważyć (Wyniki, 5.4.2) komórki z ekspresją HpAQP3, HpAQP4 oraz HpAQP6 lepiej rosną na pożywce hipoosmotycznej (w porównaniu z komórkami z ekspresją HpAQP1, HpAQP2 oraz HpAQP5), co wskazuje na mniejszą wydajność transportu wody, a tym samym sugeruje przynależność białek HpAQP3, HpAQP4 i HpAQP6 do grupy typu AQP3.

Po odkryciu pierwszych akwaporyn i potwierdzeniu, że transportują one wodę, wykazano, że mogą one transportować również glicerol (Reizer i in. 1993). Stąd, przez wiele lat funkcjonował podział na akwaporyny ortodoksyjne i akwagliceroporyny, a transport glicerolu bądź jego brak, był jedną z charakterystycznych cech określanych dla każdego, nowo odkrytego białka (Verkman i Mitra 2000). Choć obecnie wśród akwaporyn wyodrębnia się większą liczbę grup (Wstęp, 1.2), to transport glicerolu wciąż jest cechą istotną dla ich klasyfikacji. Tym samym, określenie czy białka HpAQP1-HpAQP6 transportują glicerol było istotne dla stworzenia ich pełnej charakterystyki. Wykorzystanie testu komplementacji w komórkach drożdży *S. cerevisiae* (Wyniki, 5.4.2) pozwoliło stwierdzić, że tylko białka HpAQP3 i HpAQP4 transportują glicerol. O ile brak tej możliwości w przypadku białek HpAQP1,

HpAQP2 oraz HpAQP5 nie był zaskakujący, o tyle brak transportu glicerolu przez HpAQP6 stanowił zaskoczenie. Biorąc pod uwagę skład aminokwasowy regionu ar/R, jak również wyniki uzyskane dzięki programowi PoreWalker przypuszczano, że białko to jest zdolne do transportu glicerolu. Dodatkowo fakt, że transkrypt kodujący to białko nie występował we wszystkich badanych pod tym kątem narządach zdawał się potwierdzać to założenie. Jednakże, test komplementacji wykluczył taką możliwość.

Zależność pomiędzy strukturą kanału, a przepuszczalnością dla nadtlenu wodoru (H_2O_2) nie jest znana (Bienert i Chaumont 2014). Dotychczas wykazano, że związek ten transportować mogą białka należące zarówno do grupy typu AQP1, AQP3 jak i AQP8 (Bienert i Chaumont 2014; Miller i in. 2010; Vieceli Dalla Sega i in 2017). W przeciwieństwie do AQP1 szczura, AQP1 człowieka posiada zdolność transportu H_2O_2 , choć białka te różnią się tylko 18 aminokwasami, z których żaden nie jest związany ze strukturami uznawanymi za istotne dla selektywności kanału (Bienert i Chaumont 2014). Podobna sytuacja ma miejsce w przypadku białek PIP2 z *Arabidopsis thaliana*. Część izoform ułatwia dyfuzję H_2O_2 przez błonę (PIP2;2, PIP2;4, PIP2;5 i PIP2;7), a część nie (PIP2;3, PIP2;6 i PIP2;8), choć ich sekwencje są do siebie bardzo podobne (Hooijmaijers i in. 2012). Ponadto, wykazano, że roślinne białka XIP, które nie transportują wody, transportują wydajnie H_2O_2 (Bienert i in. 2011). Tym samym, tylko poprzez badania funkcjonalne można było stwierdzić, które z białek HpAQP1-HpAQP6 transportuje H_2O_2 . Wykorzystując test komplementacji w komórkach drożdży (Wyniki, 5.4.2) wykazano, że HpAQP5 oraz HpAQP6 transportują H_2O_2 , przy czym to drugie białko charakteryzuje się znacznie wyższą wydajnością tego procesu. Co ciekawe, badania względnego poziomu ekspresji genów *HpAQP* w nodze, nerce oraz jelicie wykazały, że transkrypt *HpAQP6* wykazuje najwyższy poziom ekspresji (Wyniki, 5.2). Tak więc białko, które wydajnie transportuje H_2O_2 jest równocześnie tym, którego prawdopodobnie jest najwięcej w przebadanych narządach.

Włączenie sekwencji aminokwasowych białek HpAQP w drzewo filogenetyczne akwaporyn bezkręgowców i kręgowców (Wyniki, 5.2.6) pozwoliło stwierdzić ich przynależność tylko do jednej z czterech tradycyjnie wyróżnianych grup akwaporyn (typ AQP1, AQP3, AQP8 i AQP11), jak i konieczność wprowadzenia nowych grup tych białek do systemu ich klasyfikacji. Sekwencje aminokwasowe HpAQP1, HpAQP2 i HpAQP5 grupują się z akwaporynami grupy typu AQP1. Potwierdza to wniosek oparty o analizę bioinformatyczną, wyniki uzyskane z wyznaczenia profilu organo-specyficznej ekspresji genów oraz testu komplementacji w komórkach drożdży wskazujący, że białka te wykazują właściwości charakterystyczne dla białek zaliczanych do grupy typu AQP1. Co ciekawe, białka HpAQP1 i HpAQP2, nie wykazujące zdolności transportu H_2O_2 , znajdują się w podgrupie innej niż białko HpAQP5, które H_2O_2 transportuje.

Możliwe więc, że przy większej liczbie danych o akwaporynach mięczaków uda u tych zwierząt wyodrębnić dwie grupy akwaporyn typu AQP1, podobnie jak ma to miejsce u owadów (Grupy PRIP i DRIP; Wstęp, 1.2.1). Wniosek ten jest prawdopodobny, ponieważ analiza filogenetyczna oparta tylko na sekwencjach mięczaków wskazuje, że w typie AQP1 grupy takie występują (Colgan i Santos 2018). Pozostałe trzy białka HpAQP wchodzą w skład nie wyróżnianych dotąd grup, które nazwano malakogliceroporynami (HpAQP3 i HpAQP4) i malakoakwaporynami (HpAQP6).

Wprowadzony termin malakogliceroporyny zakłada, że białka te transportują glicerol, co zostało potwierdzone w badaniach funkcjonalnych (Wyniki, 5.4.2). Jednakże równocześnie ich sekwencje aminokwasowe nie łączą się na drzewie z grupą typu AQP3, obejmującą sekwencje akwaporyn człowieka, niesporczaków oraz mięczaków. Wynika to stąd, że cechą charakterystyczną sekwencji aminokwasowej białek grupy typu AQP3 jest długa pętla C (Anderberg i in. 2011; Hénin i in. 2008), której brak w opisywanych akwaporynach ślimaka winniczka. Tym samym, drzewo filogenetyczne budowane na podstawie sekwencji nie połączy ze sobą tych dwóch grup. Podobna sytuacja ma miejsce w przypadku grupy Eglp. Pętla C jest dłuższa niż u HpAQP3 i HpAQP4, choć nie tak długa, jak u przedstawicieli grupy typu AQP3 (Stavang i in. 2015). Tym samym białka Eglp zlokalizowane są na drzewie bliżej AQP3 niż Mglp, jednak wciąż nie tworzą z nią jednej grupy. Sugeruje się, że białka Eglp wyewoluowały z białek typu AQP1, a zdolność do transportu glicerolu uzyskały poprzez mutację prowadzącą do zmiany jednego aminokwasu w obrębie ar/R regionu (Finn i in. 2015b). Być może, taka sama sytuacja miała miejsce w przypadku malakogliceroporyn ślimaczych. Zwłaszcza, że białka Mglp nie posiadają charakterystycznego kwasu asparaginowego tuż za drugim motywem NPA, który jest jedną z cech wyznacznikowych akwaporyn typu AQP3 (Ishibashi i in. 2017). Zatem, sekwencja aminokwasowa tych akwaporyn jest jeszcze bardziej podobna do typu AQP1 niż sekwencje Eglp.

Z kolei w grupie malakoakwaporyn obok HpAQP6 znajdują się również sekwencje pochodzące z *C. gigas* i *L. gigantea*. Cechą wspólną tych sekwencji jest długi koniec C oraz region ar/R pozbawiony aminokwasu aromatycznego. Badania funkcjonalne HpAQP6 wykazały, że białko to transportuje wodę, choć mniej wydajnie niż białka grupy typu AQP1 oraz H₂O₂. Przeprowadzone badania wykluczyły transport glicerolu, pomimo budowy regionu ar/R sugerującego taką możliwość (Wstęp, 1.3). Grupa ta zdaje się być typowa tylko dla mięczaków, i wraz z inną grupą, nazwaną grupą specyficzną tylko dla roztoczy (Wstęp, 1.4.6), charakteryzuje się składem aminokwasowym regionu ar/R odpowiadający akwaporynom NIP z roślin (Liu i Zhu 2010; Abascal i in. 2014). Sugeruje się, że białka NIP w roślinach mają swoje źródło

w horyzontalnym transferze genów pochodzących z bakterii (Zardoya i in. 2002). Obecnie uważa się, że taki proces zachodził często w trakcie ewolucji akwaporyn i dotyczy większej liczby białek (Ishibashi i in. 2017). Być może malakoakwaporyny, jak i akwaporyny specyficzne tylko dla roztoczy również mają swoje źródło właśnie w tym procesie.

Analiza filogenetyczna wykazała również, że wśród białek HpAQP nie występują homologi akwaporyn grup typu AQP3, AQP8 oraz AQP11. Należy jednak pamiętać, że sekwencje aminokwasowe HpAQP uzyskano w wyniku analizy transkryptomu, a nie genomu. Dlatego też nie wszystkie akwaporyny *H. pomatia* mogły zostać zidentyfikowane. Tym bardziej, że w grupach typu AQP3, AQP8 i AQP11 znajdują się sekwencje białek innych mięczaków (Wyniki, 5.2.6).

Konsekwencją uzyskania przekonujących danych dotyczących akwaporyn *H. pomatia* była próba określenia funkcji fizjologicznej kanałów przez nie budowanych. W tym celu przeprowadzono eksperymenty polegające na wyznaczeniu zmian w poziomie ekspresji genów *HpAQP1-HpAQP6* w trakcie zapadania ślimaka w stan estywacji. Do analizy wybrano trzy narządy pełniące istotną funkcję w zachowaniu homeostazy wodnej organizmu, tj. jelito, w którym dochodzi do resorpcji wody, nerkę uczestniczącą w zagęszczaniu moczu oraz nogę, która jest największym narządem, ma bezpośredni kontakt ze środowiskiem zewnętrznym i przez nią zachodzi największe parowanie (Barker 2001). Ekspresja każdego z sześciu genów kodujących białka HpAQP analizowana była w każdym z trzech narządów (Tab. 5), co dało kombinację 17 różnych układów (*HpAQP3* nie ulega ekspresji w jelicie). Ponadto pomiary poziomu ekspresji genów wykonywano dla ślimaka aktywnego oraz pozbawionego dostępu do wody odpowiednio przez 3, 7, 15 i 35 dni. Tym samym, sprawdzono po raz pierwszy, jakie zmiany zachodzą w trakcie zapadania ślimaka w stan estywacji, a nie tylko u ślimaka już estywującego (35 dni bez wody).

Opierając się na wynikach analizy poziomu ekspresji genów *HpAQP1-HpAQP6* (Wyniki, 5.5.2) można stwierdzić, że kodowane przez nie białka pełnią ważną rolę w zachowaniu homeostazy wodnej organizmu w trakcie estywacji. Dla ślimaka aktywnego i estywującego (35 dzień bez wody) tylko w 7 układach zauważyć można spadek poziomu ekspresji genów, czyli zjawiska wyciszania, które jest typowe dla estywacji (*HpAQP4* i *HpAQP6* w jelicie, *HpAQP1*, *HpAQP2* i *HpAQP6* w nerce oraz *HpAQP1* i *HpAQP5* w nodze). W przypadku pozostałych 8 układach poziom ekspresji pozostaje na tym samym poziomie (*HpAQP1*, *HpAQP2* i *HpAQP5* w jelicie, *HpAQP3-HpAQP5* w nerce oraz *HpAQP2* i *HpAQP4* w nodze) bądź wzrasta (*HpAQP3* i *HpAQP6* w nodze). Ta sama ilość transkryptu zanotowana zarówno dla aktywnego jak i estywującego ślimaka świadczy o tym, że białko kodowane przez ten transkrypt

jest istotne dla zachowania homeostazy organizmu w obu tych stanach fizjologicznych. Warto zauważyć, że zarówno w nerce, jak i w jelicie żaden z badanych genów nie wykazuje większego poziomu ekspresji w 35. dniu bez wody niż u ślimaka aktywnego. Natomiast w nodze dochodzi do wzrostu poziomu ekspresji *HpAQP3* i *HpAQP6*. Wskazuje to na istotną rolę, jaką mogą pełnić te białka w trakcie estywacji. Dotychczasowe badania wykazały, że w nodze u ślimaka estywującego wzrasta aktywność dehydrogenazy glutaminianowej (GDH) przeprowadzającej reakcję, w wyniku której otrzymywany jest amoniak będący źródłem azotu w cyklu mocznikowym (Bell i in. 2012). Mocznik natomiast jest związkiem utrzymującym wodę w tkankach, a jego ilość znacząco wzrasta u wielu gatunków zwierząt w trakcie działania suszy, również w nodze u ślimaka afrykańskiego *Achatina fulica* (Hiong i in. 2005). Analizując właściwości *HpAQP3* i *HpAQP6* można domniemywać, że *HpAQP3* jako akwaporyna transportująca glicerol, może również być przepuszczalna dla mocznika (Geng i Yang 2017). *HpAQP6* natomiast, może transportować amoniak, który jest związkiem transportowanym przez roślinne białka NIP (Azad i in. 2016), do których białko to jest podobne pod względem struktury regionu ar/R. Możliwe więc, że powstający w nodze w wyniku działania GDH amoniak transportowany jest do hemolimfy przy udziale *HpAQP6*, a następnie trafia do wątrobotrzustki, w której powstaje mocznik. Ten z kolei, transportowany jest z hemolimfy do komórek nogi za pomocą *HpAQP3*.

Warto także zwrócić uwagę, że w przypadku *HpAQP3* oraz *HpAQP6* do zmiany poziomu ekspresji dochodzi dopiero po 7. dniach ograniczenia dostępu do wody. Do tego momentu ilość transkryptów tych genów nie wzrasta. Z kolei zmniejszenie ilości transkryptu już od 3. dnia zapadania w stan estywacji, które utrzymywane jest do momentu osiągnięcia tego stanu zachodzi tylko w przypadku *HpAQP1* i *HpAQP6* w nerce oraz *HpAQP4* w jelicie. W pozostałych przypadkach zmiany zachodzące pomiędzy ślimakiem aktywnym a ślimakiem zapadającym w stan estywacji są bardzo dynamiczne. Zwłaszcza zwracają uwagę zmiany zachodzące pomiędzy ślimakiem aktywnym, a ślimakiem po trzech dniach ograniczenia wody. Aż w siedmiu przypadkach, tj. dla *HpAQP2* we wszystkich badanych narządach, *HpAQP3* w nerce, *HpAQP1*, *HpAQP4* i *HpAQP5* w nodze, w tym okresie poziom ekspresji gwałtownie spada, po czym wzrasta do poziomu wyjściowego w 7. lub w 15. dniu zapadania w stan estywacji. Być może zjawisko to związane jest z aktywnością dobową ślimaków, który ma również związek z wilgotnością powietrza (Stępczak i Bogucki 1983). Krótkotrwały spadek wilgotności w ciągu dnia jest normalnym zjawiskiem i nie wymaga uruchamiania szczególnych mechanizmów związanych ze stresem. Trzeci dzień suszy wydaje się być momentem krytycznym, w którym

w organizmie zwierzęcia dochodzi do zmian biochemiczno-fizjologicznych pozwalających na przezwycięzenie braku wody. Warto zwrócić uwagę, że występujący po 3. dniu zapadania w stan estywacji wzrost poziomu ekspresji genów kodujących białka HpAQP, związany z „nakładem energetycznym” wydatkowanym przez ślimaka, wskazuje na istotny udział akwaporyn w przeciwdziałaniu warunkom stresu wodnego.

Co ciekawe, analiza poziomu ekspresji genów *HpAQP* w trakcie zapadania ślimaka w stan estywacji pozwala zauważyć, że kierunek zmian rzadko utrzymywany jest przez cały opisywany proces. Poza przedstawionym powyżej zjawiskiem zmian zachodzącym w 3. dniu wchodzenia w stan estywacji, należy również zwrócić uwagę na przebieg ekspresji *HpAQP4* i *HpAQP5* w nerce. Ekspresja ta utrzymuje się przez cały czas na tym samym poziomie, za wyjątkiem 7. i 15. dnia, kiedy dochodzi do gwałtownego wzrostu. Właściwie, tylko ilość transkryptu *HpAQP5* w jelicie nie ulega zmianie przez cały czas zapadania ślimaka w stan estywacji. Oznacza to, że zapadanie w stan estywacji jest procesem dynamicznym, w którym cały czas dochodzi do zmian dostosowujących organizm do niekorzystnych warunków środowiska.

Podsumowując, w niniejszej pracy przedstawiono charakterystykę akwaporyn ślimaka winniczka *Helix pomatia*, wykorzystywanego jako model w badaniach ślimaków lądowych. Zastosowanie narzędzi bioinformatycznych, testów komplementacji w komórkach drożdży *S. cerevisiae*, jak i analizy poziomu ekspresji genów pozwoliło na stwierdzenie, że geny *HpAQP1-HpAQP6* kodują białka funkcjonujące jako kanały wodne, które poza wodą mogą także transportować nadtlenek wodoru (*HpAQP5* i *HpAQP6*) i glicerol (*HpAQP3* i *HpAQP4*). Białka te pod względem filogenetycznym należą do grupy typu AQP1 (*HPAQP1*, *HpAQP2* i *HpAQP5*), jak i dwu grup dotychczas nie wyróżnianych i charakterystycznych dla mięczaków, tj. malakogliceroporyn (*HpAQP3* i *HpAQP4*) i malakoakwaporyn (*HpAQP6*). Oznacza to, że akwaporyny ślimaków nie tylko uzupełniają istniejącą już wiedzę na temat tych białek, ale również wskazują, że dotychczasowy system klasyfikacji zwierzęcych akwaporyn, obejmujący cztery grupy, jest niepełny. Ponadto, wykazano istotną rolę, jaką pełnią akwaporyny w procesie zapadania ślimaka w stan estywacji, co ma istotne znaczenie w przystosowaniu go do przetrwania dłuższego okresu suszy.

7. STRESZCZENIE

Akwaporyny to białka tworzące kanały odpowiedzialne za transport wody i małych cząsteczek pozbawionych ładunku w poprzek błon biologicznych. Pomimo badań potwierdzających ich znaczenie w procesach istotnych dla mięczaków takich, jak osmoregulacja, wydzielanie śluzu czy przeciwdziałanie stresom związanym z brakiem wody, wiedza na temat tych białek u tych organizmów jest bardzo ograniczona. Stąd, jako obiekt badań wybrano akwaporyny ślimaka winniczka *Helix pomatia* L., który jest modelem w badaniach fizjologii ślimaków lądowych. W tym celu wykonano sekwencjonowanie transkryptomów nogi i nerki tego ślimaka metodą sekwencjonowania nowej generacji (NGS, ang. Next Generation Sequencing), przeprowadzono analizę bioinformatyczną otrzymanych danych, jak i oszacowano poziom ekspresji zidentyfikowanych transkryptów, w tym z wykorzystaniem metody qPCR, dla osobników aktywnych i podlegających estywacji. Ponadto przeprowadzono test komplementacji w komórkach mutantu drożdży *Saccharomyces cerevisiae* pozbawionego funkcjonalnych akwaporyn oraz wykonano analizę filogenetyczną przewidywanych białek.

W wyniku analizy transkryptomów nogi i nerki ślimaka *H. pomatia* zidentyfikowano sześć sekwencji nukleotydowych wykazujących podobieństwo do sekwencji kodujących akwaporyny i nazwano je HpAQP1-HpAQP6. Ich translacja *in silico* umożliwiła przeprowadzenie dalszej analizy bioinformatycznej, która wskazała na obecność elementów strukturalnych charakterystycznych dla akwaporyn, tj. dwóch motywów NPA i regionu ar/R. Ponadto modele struktury przestrzennej otrzymane dla przewidywanych białek HpAQP1-HpAQP6 zawierały elementy typowe dla tej grupy białek, tj. sześć regionów transbłonowych i pięć łączących je pętli.

Analiza organo-specyficznego poziomu transkryptów HpAQP1-HpAQP6 wykazała, że są one obecne we wszystkich organach wybranych do badań (płaszcz, noga, ślinianki, żołądek, jelito tylne, wątrobotrzustka, zwoje mózgowie, płuco, nerka i gruczoł obojnaczy). Dodatkowo wykonano pomiar względnego poziomu tych transkryptów w jelicie, nerce oraz nodze. W organach tych transkrypt HpAQP6 występował w największej ilości w porównaniu z pozostałymi. Analizę poziomu transkryptów HpAQP1-HpAQP6 wykonano również u ślimaków zapadających w stan estywacji. Badania dotyczyły nogi, nerki oraz jelita u ślimaków kontrolnych oraz pozbawionych dostępu do wody przez 3, 7, 15 i 35 dni. Na podstawie zmian poziomu ekspresji genów kodujących akwaporyny można stwierdzić, że zapadanie w stan

estywacji jest procesem dynamicznym, a raz obrany kierunek zmian nie musi być utrzymywany przez cały czas trwania opisywanego procesu.

Potwierdzenie funkcjonalności przewidywanych białek wykonano za pomocą testu komplementacji w komórkach mutantu drożdży *S. cerevisiae*, pozbawionego funkcjonalnych akwaporyn. Badania wykazały, że wszystkie transkrypty HpAQP kodują białka funkcjonujące jako kanały wodne, przy czym wydajność transportu wody jest najwyższa w przypadku białek HpAQP1, HpAQP2 i HpAQP5, a najniższa dla białka HpAQP6. Za pomocą testu komplementacji wykazano także, że białka HpAQP5 i HpAQP6 oprócz wody transportują nadtlenek wodoru, natomiast białka HpAQP3 i HpAQP4 – glicerol.

Analiza filogenetyczna białek HpAQP, uwzględniająca wybrane akwaporyny bezkręgowców i kręgowców, wykazała przynależność trzech białek HpAQP do jednej z czterech tradycyjnie wyróżnianych grup akwaporyn (grupy typu AQP1, AQP3, AQP8 i AQP11). W obrębie drzewa filogenetycznego białka HpAQP1, HpAQP2 i HpAQP5 tworzą wspólny kład z białkami typu AQP1, natomiast pozostałe białka grupują się w obrębie odrębnych kładów nazwanych malakogliceroporynami (HpAQP3 i HpAQP4) oraz malakoakwaporynami (HpAQP6). Malakogliceroporyny to białka transportujące wodę i glicerol. Ich sekwencja aminokwasowa jest bardziej podobna do sekwencji akwaporyn typu AQP1, jednak wykazano eksperymentalnie, że białka te posiadają dodatkowo zdolność do transportu glicerolu. Malakoakwaporyny to grupa obejmująca białka charakteryzujące się długim C-końcem oraz regionem ar/R, w którym nie występuje aminokwas aromatyczny. Ponadto, badania funkcjonalności wykazały, że białka te oprócz wody transportują nadtlenek wodoru.

Podsumowując, przeprowadzone badania pozwoliły scharakteryzować białka tworzące kanały wodne u lądowego ślimaka *Helix pomatia* L., stosowanego jako model w badaniach ślimaków. Otrzymane wyniki zwiększają wiedzę na temat zróżnicowania akwaporyn bezkręgowców i roli tych białek w procesie estywacji. Zatem powinny przyczynić się do poszerzenia wiedzy na temat zależności filogenetycznych pomiędzy akwaporynami bezkręgowców i ulepszenia systemu ich klasyfikacji oraz głębszego zrozumienia udziału tych białek w przeciwdziałaniu skutkom ograniczenia dostępu do wody w trakcie zapadania organizmów w stan estywacji.

8. ABSTRACT

Transport of water and small uncharged molecules across prokaryotic and eukaryotic cell membranes is supported by aquaporins (AQPs). Nevertheless, molluscs have been very poorly explored in this aspect although several important processes characteristic for the animals, such as osmoregulation, mucus secretion, or defense against desiccation, require AQP participation. Therefore, research on these proteins of *Helix pomatia* (L), applied as a model in studies on terrestrial snail physiology, were the subject of the studies. These were done by next generation sequencing (NGS) of the snail foot and kidney transcriptome, and consecutive bioinformatic analysis of the predicted proteins as well as the encoding transcript expression estimation including qPCR for active and aestivating specimens. Moreover, the predicted protein functional analysis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells depleted of functional AQPs and the predicted protein phylogenetic analysis were performed.

The obtained *H. pomatia* foot and kidney transcriptomes and homology analysis using available AQP encoding sequences allowed for prediction of six AQP encoding sequences, named HpAQP1-HpAQP6. These sequences were translated *in silico* and analyzed bioinformatically. The analysis revealed the presence of two NPA motifs and ar/R region conserved for AQP proteins. Likewise, modeling of three dimensional structure for the predicted HpAQP1-HpAQP6 proteins indicated typical AQP features, namely six transmembrane regions connected by five loops. Analysis of organ-specific expression patterns of HpAQP1-HpAQP6 demonstrated ubiquitous presence of the six transcripts in tested snail organs, i.e. in mantle, feet, salivary glands, stomach, posterior intestine, hepatopancreas, cerebral ganglia, lung, kidney, and hermaphrodite gland. In addition, estimation of relative gene expression levels performed by qPCR for intestine, kidney, and foot revealed the highest expression level of HpAQP6. The same analysis performed for *H. pomatia* specimens during an entrance into the aestivation state; i.e. for their three organs (foot, kidney and intestine) and five points of time (control, 3, 7, 15 and 35 days without water) indicated that the entrance into the aestivation state was a dynamic process as far as HpAQP expression was concerned. The changes in expression included both decrease and increase levels of transcripts.

The complementary assay performed in *S. cerevisiae* proper mutant cells indicated that the predicted HpAQP1-HpAQP6 proteins were functional. This denotes that they are able to form water channels, although of different transport efficiency. Namely, HpAQP1, HpAQP2, and HpAQP5 showed the highest water transport efficiency, while HpAQP6 the lowest one. The same complementary assay allowed to demonstrate

additional transport capabilities of HpAQPs; i.e. HpAQP5 and particularly HpAQP6 transported also H₂O₂, whereas HpAQP3 and HpAQP4 were also permeable for glycerol.

Phylogenetic analysis including invertebrate and vertebrate AQPs and the predicted HpAQPs indicated that three of the predicted proteins belonged to only one of the four earlier established AQP groups. This concerns AQP1-like group and HpAQP1, HpAQP2, and HpAQP5. The rest of the predicted HpAQPs appears to represent two new groups named malakoglyceroporins (HpAQP3 and HpAQP4) and malakoaquaporins (HpAQP6). Malakoglyceroporins (Mglps) are proteins of amino acid sequences similar to the sequences of AQP1-like group members but additionally to water transport, they have the ability to permeate glycerol. Malakoaquaporins (Maqps) are characterized by long C-end and lack of aromatic amino acid in ar/R region. Moreover, functional assay in yeast demonstrated that they transported H₂O₂ in addition to water.

The studies provide functional characteristic of water channel proteins bioinformatically predicted for the terrestrial gastropod *Helix pomatia* L. The obtained results extend knowledge about invertebrate aquaporin diversity, and contribute to the protein classification improvement and better understanding of the protein role in defense against desiccation during entrance into aestivation.

Podziękowania

Niniejsza praca nie powstałaby, gdyby nie pomoc i wsparcie wielu osób, którym chciałabym bardzo podziękować. Mojemu promotorowi, prof. dr hab. Andrzejowi Lesickiemu dziękuję za umożliwienie realizacji pracy doktorskiej i konstruktywne dyskusje w trakcie jej pisanie. Dziękuję za poświęcony czas, cierpliwość i życzliwość. Dziękuję Mu za wszelką pomoc, jakiej mi udzielił przez wszystkie lata naszej współpracy.

Dr Joannie Pieńkowskiej dziękuję za wsparcie w trakcie realizacji prac laboratoryjnych, za pomoc przy eksperymentach, które często toczyły się do późnych godzin wieczornych. Dziękuję za wsparcie, zarówno w pracy, jak i w życiu osobistym, bez którego pewnie nie raz bym się poddała i nie osiągnęła wyznaczonych celów. Prof. dr hab. Hannie Kmicie dziękuję za przekonanie mnie, że nie liczy się ilość, a jakość.

Darii Grobys i Antkowi Karachitosowi dziękuję, że „oswoili” dla mnie drożdże i pomagali znaleźć rozwiązanie, choć wydawało mi się, że nie ma już wyjścia. Uli Sobczyńskiej dziękuję za wprowadzenie mnie w tajniki świata modelowania struktury białek oraz bardzo ciekawe rozmowy, które nie raz pozwalały mi się zdystansować do pojawiających się problemów. Pracownikom Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej oraz Zakładu Wirusologii Molekularnej dziękuję za umożliwienie korzystania z ich sprzętu. Wszystkim pracownikom Zakładu Biologii Komórki dziękuję za pomoc, miłą atmosferę i motywowanie mnie do pracy.

Dziękuję moim Rodzicom za wsparcie, wyrozumiałość i cierpliwość, które pozwoliły mi realizować obraną życiową drogę.

Mojemu mężowi: Kuba, dziękuję Ci za wszystkie niesamowite dyskusje o nauce, za możliwość omawiania z Tobą nawet najbardziej zawiłych problemów laboratoryjnych, choć czasem były one dla Ciebie kompletną abstrakcją. Za wsparcie, motywację i nocne dyżury z Szymonem, tak bym ja mogła się wyspać.

9. LITERATURA

1. Abascal F, Irisarri I, Zardoya R. (2014) Diversity and evolution of membrane intrinsic proteins. *Biochim Biophys Acta* 1840: 1468-1481.
2. Agre P, Sasaki S, Chrispeels MJ. (1993) Aquaporins: a family of water channel proteins. *Am J Physiol* 265: F461.
3. Anderberg HI, Danielson JÅ, Johanson U. (2011) Algal MIPs, high diversity and conserved motifs. *BMC Evol Biol* 21: 110.
4. Assentoft M, Kaptan S, Schneider HP, Deitmer JW, de Groot BL, MacAulay N. (2016) Aquaporin 4 as a NH₃ Channel. *J Biol Chem* 291: 19184-19195.
5. Azad AK, Ahmed J, Alum MA, Hasan MM, Ishikawa T, Sawa Y, Katsuhara M. (2016) Genome-Wide Characterization of Major Intrinsic Proteins in Four Grass Plants and Their Non-Aqua Transport Selectivity Profiles with Comparative Perspective. *PLoS One* 11: e0157735.
6. Ball A, Campbell EM, Jacob J, Hoppler S, Bowman AS. (2009) Identification, functional characterization and expression patterns of a water-specific aquaporin in the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Insect Biochem Mol Biol* 39: 105-112.
7. Barker GM. (2001) The biology of terrestrial molluscs. CABI Publishing, Nowy Jork
8. Beitz E, Wu B, Holm LM, Schultz JE, Zeuthen T. (2006) Point mutations in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycerol, ammonia, and protons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 269-274.
9. Bell RA, Dawson NJ, Storey KB. (2012) Insights into the in vivo regulation of glutamate dehydrogenase from the foot muscle of an estivating land snail. *Enzyme Res* 2012: 317314-317324.
10. Bender RC, Broderick EJ, Goodall CP, Bayne CJ. (2005) Respiratory burst of *Biomphalaria glabrata* hemocytes: *Schistosoma mansoni*-resistant snails produce more extracellular H₂O₂ than susceptible snails. *J Parasitol* 91: 275-279.
11. Benga G. (2012) On the definition, nomenclature and classification of water channel proteins (aquaporins and relatives). *Mol Aspects Med* 33: 514-517.
12. Benoit JB, Hansen IA, Szuter EM, Drake LL, Burnett DL, Attardo GM. (2014) Emerging roles of aquaporins in relation to the physiology of blood-feeding arthropods. *J Comp Physiol B* 184: 811-825.

13. Bienert GP, Bienert MD, Jahn TP, Boutry M, Chaumont F. (2011) Solanaceae XIPs are plasma membrane aquaporins that facilitate the transport of many uncharged substrates. *Plant J* 66: 306-317.
14. Bienert GP, Chaumont F. (2014) Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 1840: 1596-1604.
15. Błaszak C. (2009) *Zoologia. Bezkręgowce* Tom 1. PWN, Warszawa s.497-499.
16. Brunelli E, Perrotta I, Bonacci A, Tripepi S. (2007) Differential expression of aquaporin 3 in *Triturus italicus* from larval to adult epidermal conversion. *Eur J Histochem* 51: 25-32.
17. Calamita G, Bishai WR, Preston GM, Guggino WB, Agre P. (1995) Molecular cloning and characterization of AqpZ, a water channel from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 270: 29063-29066.
18. Calamita G, Ferri D, Gena P, Liquori GE, Cavalier A, Thomas D, Svelto M. (2005) The inner mitochondrial membrane has aquaporin-8 water channels and is highly permeable to water. *J Biol Chem* 280: 17149-17153.
19. Cameron R. (2016) *Slug and snails*. William Collins, London s. 156-160
20. Campbell EM, Ball A, Hoppler S, Bowman AS. (2008) Invertebrate aquaporins: a review. *J Comp Physiol B* 178: 935-955.
21. Cerdà J, Chauvigné F, Finn RN. (2017) The Physiological Role and Regulation of Aquaporins in Teleost Germ Cells. *Adv Exp Med Biol* 969: 149-171.
22. Chauvigné F, Boj M, Finn RN, Cerdà J. (2015) Mitochondrial aquaporin-8-mediated hydrogen peroxide transport is essential for teleost spermatozoon motility. *Sci Rep* 14: 7789.
23. Chng YR, Ong JL, Ching B, Chen XL, Hiong KC, Wong WP, Chew SF, Lam SH, Ip YK. (2016) Molecular Characterization of Aquaporin 1 and Aquaporin 3 from the Gills of the African Lungfish, *Protopterus annectens*, and Changes in Their Branchial mRNA Expression Levels and Protein Abundance during Three Phases of Aestivation *Front Physiol* 10: 532.
24. Chomczynski P. (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15: 532-534, 536-537.
25. Colgan DJ, Santos RP. (2018) A phylogenetic classification of gastropod aquaporins. *Mar Genomics* 38: 59-65.
26. Danielson JA, Johanson U. (2008) Unexpected complexity of the aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biol* 22: 45.
27. da Silva IV, Soveral G. (2017) Aquaporins in obesity. *Adv Exp Med Biol* 969: 227-238.

28. Day RE, Kitchen P, Owen DS, Bland C, Marshall L, Conner AC, Bill RM, Conner MT. (2014) Human aquaporins: regulators of transcellular water flow. *Biochim Biophys Acta* 1840: 1492-1506.
29. Dong C, Chen L, Feng J, Xu J, Mahboob S, Al-Ghanim K, Li X, Xu P. (2016) Genome Wide Identification, Phylogeny, and Expression of Aquaporin Genes in Common Carp (*Cyprinus carpio*). *PLoS One* 11: e0166160.
30. Drake LL, Boudko DY, Marinotti O, Carpenter VK, Dawe AL, Hansen IA. (2010) The Aquaporin gene family of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *PLoS One* 5: e15578.
31. Drake LL, Rodriguez SD, Hansen IA. (2015) Functional characterization of aquaporins and aquaglyceroporins of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Sci Rep* 15: 7795.
32. Endeward V, Musa-Aziz R, Cooper GJ, Chen LM, Pelletier MF, Virkki LV, Supuran CT, King LS, Boron WF, Gros G. (2006) Evidence that aquaporin 1 is a major pathway for CO₂ transport across the human erythrocyte membrane. *FASEB J* 20: 1974-1981.
33. Fabrick JA, Pei J, Hull JJ, Yool AJ. (2014) Molecular and functional characterization of multiple aquaporin water channel proteins from the western tarnished plant bug, *Lygus hesperus*. *Insect Biochem Mol Biol* 45: 125-140.
34. Fields S, Johnston M. (2005) Cell biology. Whither model organism research? *Science* 307: 1885-1886.
35. Finn RN, Chauvigné F, Hlidberg JB, Cutler CP, Cerdà J. (2014) The lineage-specific evolution of aquaporin gene clusters facilitated tetrapod terrestrial adaptation. *PLoS One* 9: e113686.
36. Finn RN, Cerdà J. (2015a) Evolution and functional diversity of aquaporins. *Biol Bull* 229: 6-23.
37. Finn RN, Chauvigné F, Stavang JA, Belles X, Cerdà J. (2015b) Insect glycerol transporters evolved by functional co-option and gene replacement. *Nat Commun* 6: 7814.
38. Fischer G, Kosinska-Eriksson U, Aponte-Santamaría C, Palmgren M, Geijer C, Hedfalk K, Hohmann S, de Groot BL, Neutze R, Lindkvist-Petersson K. (2009) Crystal structure of a yeast aquaporin at 1.15 angstrom reveals a novel gating mechanism. *PLoS Biol* 7:e1000130.
39. Foguesatto K, Boyle RT, Rovani MT, Freire CA, Souza MM. (2017) Aquaporin in different moult stages of a freshwater decapod crustacean: Expression and participation in muscle hydration control. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 208: 61-69.

40. Frick A, Eriksson UK, de Mattia F, Oberg F, Hedfalk K, Neutze R, de Grip WJ, Deen PM, Törnroth-Horsefield S. (2014) X-ray structure of human aquaporin 2 and its implications for nephrogenic diabetes insipidus and trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 6305-6310.
41. Frohman MA. (1993) Rapid amplification of cDNA ends: Thermal RACE. *Methods Enzymol* 218:340-356.
42. Fu D, Libson A, Miercke LJ, Weitzman C, Nollert P, Krucinski J, Stroud RM. (2000) Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science* 290: 481-486.
43. Geng X, Yang B. (2017) Transport Characteristics of Aquaporins. *Adv Exp Med Biol* 969: 51-62.
44. Gonen T, Cheng Y, Sliz P, Hiroaki Y, Fujiyoshi Y, Harrison SC, Walz T. (2006) Lipid-protein interactions in double-layered two-dimensional AQP0 crystals. *Nature* 438: 633-638.
45. Goto SG, Lee RE Jr, Denlinger DL. (2015) Aquaporins in the antarctic midge, an extremophile that relies on dehydration for cold survival. *Biol Bull* 229: 47-57.
46. Goto SG, Philip BN, Teets NM, Kawarasaki Y, Lee RE Jr, Denlinger DL. (2011) Functional characterization of an aquaporin in the Antarctic midge *Belgica antarctica*. *J Insect Physiol* 57: 1106-1114.
47. Greenfield JP, Xu H, Greengard P, Gandy S, Seeger M. (1999) Generation of the amyloid-beta peptide N terminus in *Saccharomyces cerevisiae* expressing human Alzheimer's amyloid-beta precursor protein. *J Biol Chem* 274: 33843–33846.
48. Grohme MA, Mali B, Welnicz W, Michel S, Schill RO, Frohme M. (2013) The Aquaporin Channel Repertoire of the Tardigrade *Milnesium tardigradum*. *Bioinform Biol Insights* 26: 153-165.
49. Gupta AB, Verma RK, Agarwal V, Vajpai M, Bansal V, Sankararamakrishnan R. (2012) MIPModDB: a central resource for the superfamily of major intrinsic proteins. *Nucleic Acids Res* 40: D362-D369.
50. Hartwell LH. (2002) Nobel lecture. Yeast and cancer. *Biosci Rep* 22: 373–394.
51. Hendriks G, Koudijs M, van Balkom BW, Oorschot V, Klumperman J, Deen PM, van der Sluijs P. (2004) Glycosylation is important for cell surface expression of the water channel aquaporin-2 but is not essential for tetramerization in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 279: 2975-2983.
52. Hénin J, Tajkhorshid E, Schulten K, Chipot C. (2008) Diffusion of glycerol through *Escherichia coli* aquaglyceroporin GlpF. *Biophys J* 94: 832-839.
53. Herrera M, Garvin JL. (2011) Aquaporins as gas channels. *Pflugers Arch* 462: 623-630.

54. Hiong KC, Loong AM, Chew SF, Ip YK. (2005). Increases in urea synthesis and the ornithine-urea cycle capacity in the giant African snail, *Achatina fulica*, during fasting or aestivation, or after the injection with ammonium chloride. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 303: 1040-1053.
55. Ho JD, Yeh R, Sandstrom A, Chorny I, Harries WE, Robbins RA, Miercke LJ, Stroud RM. (2009) Crystal structure of human aquaporin 4 at 1.8 Å and its mechanism of conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 7437-7442.
56. Hohmann J, Bill RM, Kayingo J, Prior BA. (2000) Microbial MIP channels. *Trends Microbiol* 8:33-38.
57. Hooijmaijers C, Rhee JY, Kwak KJ, Chung GC, Horie T, Katsuhara M, Kang H. (2012) Hydrogen peroxide permeability of plasma membrane aquaporins of *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Res* 125: 147-153.
58. Horsefield R, Nordén K, Fellert M, Backmark A, Törnroth-Horsefield S, Terwisscha van Scheltinga AC, Kvassman J, Kjellbom P, Johanson U, Neutze R. (2008) High-resolution x-ray structure of human aquaporin 5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 13327-13332.
59. Huang CG, Lamitina T, Agre P, Strange K. (2007) Functional analysis of the aquaporin gene family in *Caenorhabditis elegans*. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C1867-C1873.
60. Hub JS, de Groot BL. (2008) Mechanism of selectivity in aquaporins and aquaglyceroporins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 1198-1203.
61. Ibanez F, Hancock J, Tamborindeguy C. (2014) Identification and expression analysis of aquaporins in the potato psyllid, *Bactericera cockerelli*. *PLoS One* 9: e111745.
62. Ishibashi K. (2006) Aquaporin subfamily with unusual NPA boxes. *Biochim Biophys Acta* 1758: 989-993.
63. Ishibashi K, Morishita Y, Tanaka Y. (2017) The Evolutionary Aspects of Aquaporin Family. *Adv Exp Med Biol* 969: 35-50.
64. Ishibashi K, Tanaka Y, Morishita Y. (2014) The role of mammalian superaquaporins inside the cell. *Biochim Biophys Acta* 1840: 1507-1512.
65. Jauh GY, Fischer AM, Grimes HD, Ryan CA Jr, Rogers JC. (1998) delta-Tonoplast intrinsic protein defines unique plant vacuole functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 12995-12999.
66. Jensen MO, Tajkhorshid E, Schulten K. (2001) The mechanism of glycerol conduction in aquaglyceroporins. *Structure* 9: 1083-1093.

67. Jing X, White TA, Luan J, Jiao C, Fei Z, Douglas AE. (2016) Evolutionary conservation of candidate osmoregulation genes in plant phloem sap-feeding insects. *Insect Mol Biol* 25: 251-258.
68. Kaptan S, Assentoft M, Schneider HP, Fenton RA, Deitmer JW, MacAulay N, de Groot BL. (2015) H95 Is a pH-Dependent Gate in Aquaporin 4. *Structure* 23: 2309-2318.
69. Katsuhara M, Hanba YT. (2008) Barley plasma membrane intrinsic proteins (PIP Aquaporins) as water and CO₂ transporters. *Pflügers Arch* 456: 687-691.
70. Kaufmann N, Mathai JC, Hill WG, Dow JA, Zeidel ML, Brodsky JL. (2005) Developmental expression and biophysical characterization of a *Drosophila melanogaster* aquaporin. *Am J Physiol Cell Physiol* 289: C397-407.
71. Kikawada T, Saito A, Kanamori Y, Fujita M, Snigórska K, Watanabe M, Okuda T. (2008) Dehydration-inducible changes in expression of two aquaporins in the sleeping chironomid, *Polypedilum vanderplanki*. *Biochim Biophys Acta* 17782: 514-520.
72. Kirscht A, Kaptan SS, Bienert GP, Chaumont F, Nissen P, de Groot BL, Kjellbom P, Gourdon P, Johanson U. (2016) Crystal Structure of an Ammonia-Permeable Aquaporin. *PLoS Biol* 14: e1002411.
73. Kitchen P, Day RE, Salman MM, Conner MT, Bill RM, Conner AC. (2015). Beyond water homeostasis: Diverse functional roles of mammalian aquaporins. *Biochim Biophys Acta* 1850: 2410-2421.
74. Kosicka E, Grobys D, Kmita H, Lesicki A, Pieńkowska JR. (2016) Putative new groups of invertebrate water channels based on the snail *Helix pomatia* L. (Helicidae) MIP protein identification and phylogenetic analysis. *Eur J Cell* 95: 543-551.
75. Kosinska Eriksson U, Fischer G, Friemann R, Enkavi G, Tajkhorshid E, Neutze R. (2013) Subangstrom resolution X-ray structure details aquaporin-water interactions. *Science* 340: 1346-1349.
76. Kozono D, Ding X, Iwasaki I, Meng X, Kamagata Y, Agre P, Kitagawa Y. (2003) Functional expression and characterization of an archaeal aquaporin AqpM from methanothermobacter marburgensis. *J Biol Chem* 278:10649-10656.
77. Kreida S, Törnroth-Horsefield S. (2015) Structural insights into aquaporin selectivity and regulation. *Curr Opin Struct Biol* 33: 126-134.
78. Kumari SS, Gandhi J, Mustehsan MH, Eren S, Varadaraj K. (2013) Functional characterization of an AQP0 missense mutation, R33C, that causes dominant congenital lens cataract, reveals impaired cell-to-cell adhesion. *Exp Eye Res* 116: 371-385.

79. Laforenza U, Bottino C, Gastaldi G. (2016a) Mammalian aquaglyceroporin function in metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1858: 1-11.
80. Laforenza U, Pellavio G, Marchetti AL, Omes C, Todaro F, Gastaldi G. (2016b) Aquaporin-Mediated Water and Hydrogen Peroxide Transport Is Involved in Normal Human Spermatozoa Functioning. *Int J Mol Sci* 18 p: E66.
81. Lee JK, Khademi S, Harries W, Savage D, Miercke L, Stroud RM. (2004) Water and glycerol permeation through the glycerol channel GlpF and the aquaporin family. *J Synchrotron Radiat* 11: 86-88.
82. Lee JK1, Kozono D, Remis J, Kitagawa Y, Agre P, Stroud RM. (2005) Structural basis for conductance by the archaeal aquaporin AqpM at 1.68 Å. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 18932-18937.
83. Li C, Wang W. (2014) Urea transport mediated by aquaporin water channel proteins. *Subcell Biochem* 73: 227-265.
84. Li C, Wang W. (2017) Molecular Biology of Aquaporins. *Adv Exp Med Biol* 969: 1-34.
85. Liu Q, Zhu Z. (2010) Functional divergence of the NIP III subgroup proteins involved altered selective constraints and positive selection. *BMC Plant Biol* 10: 256.
86. Luyten K, Albertyn J, Skibbe WF, Prior BA, Ramos J, Thevelein JM, Hohmann S. (1995) Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *EMBO J* 14: 1360-1371.
87. Maurel C, Boursiac Y, Luu DT, Santoni V, Shahzad Z. Verdoucq L. (2015) Aquaporins in Plants. *Physiol Rev* 95: 1321-1358
88. Maurel C, Reizer J, Schroeder JI, Chrispeels MJ, Saier MH Jr. (1994) Functional characterization of the *Escherichia coli* glycerol facilitator, GlpF, in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 269: 11869-11872.
89. Meng J, Zhu Q, Zhang L, Li C, Li L, She Z, Huang B, Zhang G. (2013) Genome and transcriptome analyses provide insight into the euryhaline adaptation mechanism of *Crassostrea gigas*. *PLoS One* 8: e58563.
90. Miller EW, Dickinson BC, Chang CJ. (2010) Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 15681-15686.
91. Mitani-Ueno N, Yamaji N, Zhao FJ, Ma JF. (2011) The aromatic/arginine selectivity filter of NIP aquaporins plays a critical role in substrate selectivity for silicon, boron, and arsenic. *J Exp Bot* 62: 4391-4398.

92. Mizrahi T, Goldenberg S, Heller J, Arad Z. (2015) Natural variation in resistance to desiccation and heat shock protein expression in the land snail *Theba pisana* along a climatic gradient. *Physiol Biochem Zool* 88: 66-80.
93. Molinas SM, Trumper L, Marinelli RA. (2012) Mitochondrial aquaporin-8 in renal proximal tubule cells: evidence for a role in the response to metabolic acidosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 303: F458-466.
94. Muchowski PJ, Ning K, D'Souza-Schorey C, Fields S. (2002) Requirement of an intact microtubulecytoskeleton for aggregation and inclusion body formation by a mutant huntingtin fragment. *Proc Natl Acad Sci Unites States Am* 99: 727–732.
95. Nagae T, Miyake S, Kosaki S, Azuma M. (2013) Identification and characterisation of a functional aquaporin water channel (*Anomala cuprea* DRIP) in a coleopteran insect. *J Exp Biol* 216: 2564-2572.
96. Németh-Cahalan KL, Kalman K, Hall JE. (2004) Molecular basis of pH and Ca^{2+} regulation of aquaporin water permeability. *J Gen Physiol* 123: 573-80.
97. Newby ZE, O'Connell J 3rd, Robles-Colmenares Y, Khademi S, Miercke LJ, Stroud RM. (2008) Crystal structure of the aquaglyceroporin PfAQP from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Nat Struct Mol Biol* 15: 619-625.
98. Nicolai A, Filser J, Lenz R, Bertrand C, Charrier M. (2011) Adjustment of metabolite composition in the haemolymph to seasonal variations in the land snail *Helix pomatia*. *J Comp Physiol B* 181: 457-466.
99. Nowakowska A, Caputa M, Rogalska J. (2011) Defence against oxidative stress in two species of land snails (*Helix pomatia* and *Helix aspersa*) subjected to estivation. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* 315: 593-601.
100. Nowakowska A, Swiderska-Kołacz G, Rogalska J, Caputa M. (2009) Antioxidants and oxidative stress in *Helix pomatia* snails during estivation. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 150: 481-486.
101. Nyblom M, Frick A, Wang Y, Ekvall M, Hallgren K, Hedfalk K, Neutze R, Tajkhorshid E, Törnroth-Horsefield S. (2009) Structural and functional analysis of SoPIP2;1 mutants adds insight into plant aquaporin gating. *J Mol Biol* 387: 653-668.
102. Öberg F, Sjöhamn J, Fischer G, Moberg A, Pedersen A, Neutze R, Hedfalk K. (2011) Glycosylation increases the thermostability of human aquaporin 10 protein. *J Biol Chem* 286: 31915-31923.
103. Pakay JL, Withers PC, Hobbs AA, Guppy M. (2002) In vivo downregulation of protein synthesis in the snail *Helix aspersa* during estivation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283: R197-204.

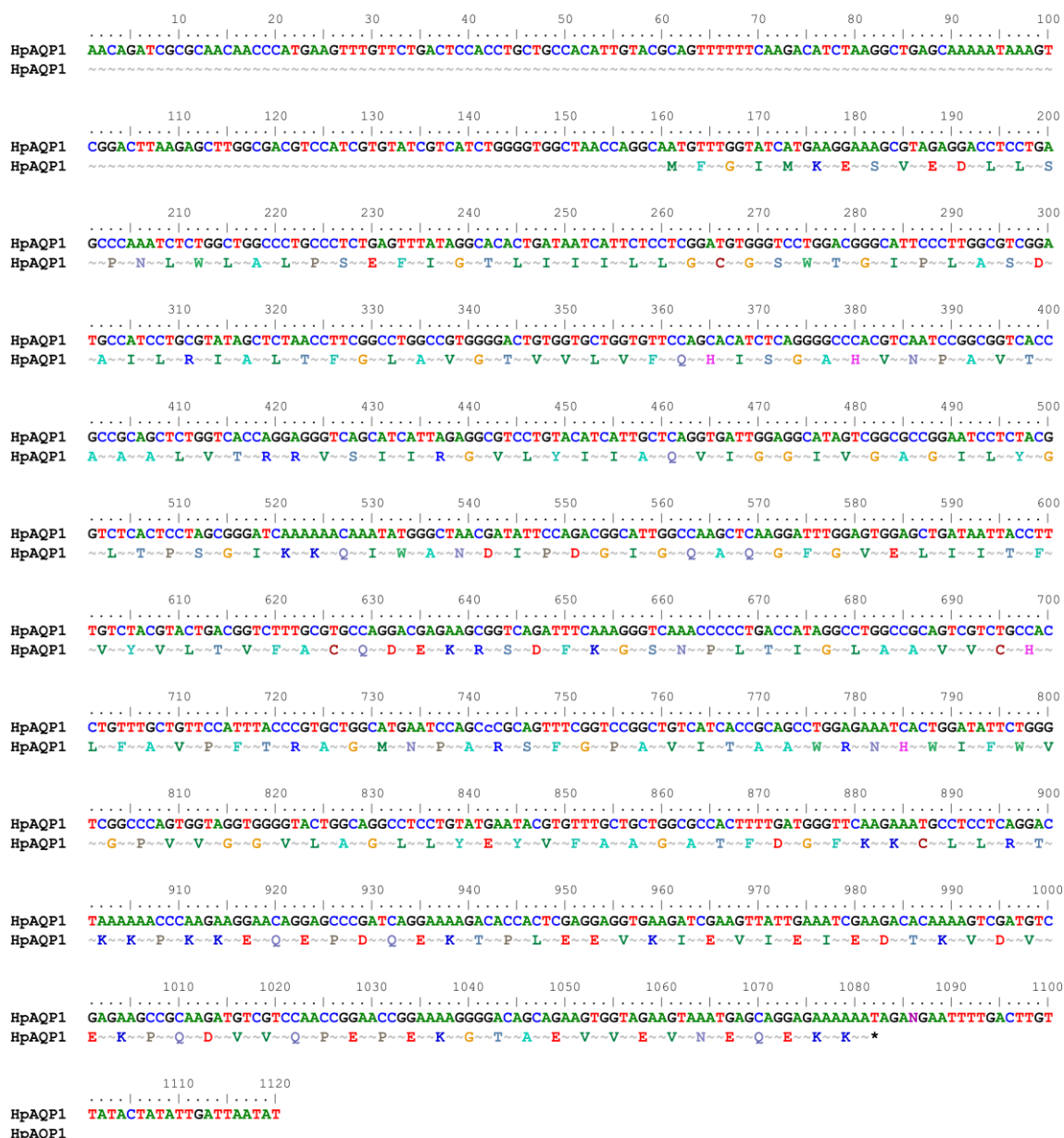
104. Perez Di Giorgio J, Soto G, Alleva K, Jozefkowicz C, Amodeo G, Muschietti JP, Ayub ND. (2014) Prediction of aquaporin function by integrating evolutionary and functional analyses. *J Membr Biol* 247: 107-125.
105. Pieńkowska JR, Kosicka E, Wojtkowska M, Kmita H, Lesicki A. (2014) Molecular identification of first putative aquaporins in snails. *J Membr Biol* 247: 239-252.
106. Philip BN, Kiss AJ, Lee RE Jr. (2011) The protective role of aquaporins in the freeze-tolerant insect *Eurosta solidaginis*: functional characterization and tissue abundance of EsAQP1. *J Exp Biol* 214: 848-857.
107. Philip BN, Lee RE Jr. (2010) Changes in abundance of aquaporin-like proteins occurs concomitantly with seasonal acquisition of freeze tolerance in the goldenrod gall fly, *Eurosta solidaginis*. *J Insect Physiol* 56: 679-685.
108. Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P. (1992) Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 17: 385-387. Reichow SL, Gonen T. (2008) Noncanonical binding of calmodulin to aquaporin-0: implications for channel regulation. *Structure* 16: 1389-1398.
109. Ramnanan CJ, Storey KB. (2006) Suppression of Na⁺/K⁺-ATPase activity during estivation in the land snail *Otala lactea*. *J Exp Biol* 209: 677-688.
110. Reichow SL, Gonen T. (2008) Noncanonical binding of calmodulin to aquaporin-0: implications for channel regulation. *Structure* 16: 1389-98.
111. Reizer J, Reizer A, Saier MH Jr. (1993) The MIP family of integral membrane channel proteins: sequence comparisons, evolutionary relationships, reconstructed pathway of evolution, and proposed functional differentiation of the two repeated halves of the proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 28: 235-257.
112. Rizzatti ACS, Romero SMB. (2001) Heart rate and body weight alterations in juvenile specimens of the tropical land snail *Megalobulimus sanctipauli* during dormancy. *Braz J Med Biol Res* 34: 959-967.
113. Rodrigues C, Mósca AF, Martins AP, Nobre T, Prista C, Antunes F, Cipak Gasparovic A, Soveral G. (2016) Rat Aquaporin-5 Is pH-Gated Induced by Phosphorylation and Is Implicated in Oxidative Stress. *Int J Mol Sci* 17.
114. Sabir F, Loureiro-Dias MC, Soveral G, Prista C. (2017) Functional relevance of water and glycerol channels in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 364.
115. Sabir F, Prista C, Madeira A, Moura T, Loureiro-Dias MC, Soveral G. (2016) Water Transport in Yeasts. *Adv Exp Med Biol* 892: 107-124.
116. Savage DF, Egea PF, Robles-Colmenares Y, O'Connell JD 3rd, Stroud RM. (2003) Architecture and selectivity in aquaporins: 2.5 Å X-ray structure of aquaporin Z. *PLoS Biol* 1: E72.

117. Schmidt-Nielsen K. (2008) Fizjologia zwierząt. Adaptacja do środowiska. PWN, Warszawa
118. Socal RR, Rohlf FJ. (1995) Biometry, 3rd edn. Freeman, New York.
119. Soto G, Alleva K, Amodeo G, Muschietti J, Ayub ND. (2012) New insight into the evolution of aquaporins from flowering plants and vertebrates: orthologous identification and functional transfer is possible. *Gene* 503: 165-176.
120. Spring JH, Robichaux SR, Hamlin JA. (2009) The role of aquaporins in excretion in insects. *J Exp Biol* 212: 358-362.
121. Spring JH, Robichaux SR, Kaufmann N, Brodsky JL. (2007) Localization of a *Drosophila* DRIP-like aquaporin in the Malpighian tubules of the house cricket, *Acheta domesticus*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 148: 92-100.
122. Stavang JA, Chauvigné F, Kongshaug H, Cerdà J, Nilsen F, Finn RN. (2015) Phylogenomic and functional analyses of salmon lice aquaporins uncover the molecular diversity of the superfamily in Arthropoda. *BMC Genomics* 19: 618.
123. Stępczak K, Bogucki Z. (1983) Ślimak winniczek (*Helix pomatia* L.) biologia, morfologia muszli, problemy przechowywania i transportu. PWN s: 13-35.
124. Storey KB. (2002) Life in the slow lane: molecular mechanisms of estivation. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 133: 733-754.
125. Storey KB, Storey JM. (1990) Metabolic rate depression and biochemical adaptation in anaerobiosis, hibernation and estivation. *Q Rev Biol* 65: 145-174.
126. Sui H, Han BG, Lee JK, Walian P, Jap BK. (2001). Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature* 414: 872-878.
127. Sun J, Mu H, Zhang H, Chandramouli KH, Qian PY, Wong CKC, Qiu JW. (2013) Understanding the Regulation of Estivation in a Freshwater Snail through iTRAQ-Based Comparative Proteomics. *J. Proteome Res* 12: 5271–5280.
128. Suzuki M, Hasegawa T, Ogushi Y, Tanaka S. (2007) Amphibian aquaporins and adaptation to terrestrial environments: a review. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 148: 72-81.
129. Suzuki M, Tanaka S.(2009) Molecular and cellular regulation of water homeostasis in anuran amphibians by aquaporins. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 153: 231-241.
130. Takata K, Matsuzaki T, Tajika Y. (2004) Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane. *Prog Histochem Cytochem* 39: 1-83.
131. Tatsumi K, Tsuji S, Miwa H, Morisaku T, Nuriya M, Orihara M, Kaneko K, Okano H, Yasui M (2009) *Drosophila* big brain does not act as a water channel, but mediates cell adhesion. *FEBS Lett* 583: 2077-2082.

132. Törnroth-Horsefield S, Wang Y, Hedfalk K, Johanson U, Karlsson M, Tajkhorshid E, Neutze R, Kjellbom P. (2006) Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature* 439: 688-694.
133. Törnroth-Horsefield S, Hedfalk K, Fischer G, Lindkvist-Petersson K, Neutze R. (2010) Structural insights into eukaryotic aquaporin regulation. *FEBS Lett* 584: 2580-2588.
134. Valdez DM Jr, Hara T, Miyamoto A, Seki S, Jin B, Kasai M, Edashige K. (2006) Expression of aquaporin-3 improves the permeability to water and cryoprotectants of immature oocytes in the medaka (*Oryzias latipes*). *Cryobiology* 53: 160-168.
135. Van Ekert E, Chauvigné F, Finn RN, Mathew LG, Hull JJ, Cerdà J, Fabrick JA. (2016) Molecular and functional characterization of *Bemisia tabaci* aquaporins reveals the water channel diversity of hemipteran insects. *Insect Biochem Mol Biol* 77: 39-51.
136. Verkman AS. (2006) Aquaporins in endothelia. *Kidney Int* 69: 1120-1123.
137. Verkman AS. (2011) Aquaporins at a glance. *J Cell Sci* 124: 2107-2112.
138. Verkman AS, Mitra AK. (2000) Structure and function of aquaporin water channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: F13-28.
139. Verma RK, Gupta AB, Sankararamakrishnan R. (2015) Major intrinsic protein superfamily: channels with unique structural features and diverse selectivity filters. *Methods Enzymol* 557: 485-520.
140. Vieceli Dalla Sega F, Prata C, Zambonin L, Angeloni C, Rizzo B, Hrelia S, Fiorentini D. (2017) Intracellular cysteine oxidation is modulated by aquaporin-8-mediated hydrogen peroxide channeling in leukaemia cells. *Biofactors* 43: 232-242.
141. Von Bülow J, Beitz E. (2015) Number and regulation of protozoan aquaporins reflect environmental complexity. *Biol Bull* 229: 38-46.
142. Wallace IS, Shakesby AJ, Hwang JH, Choi WG, Martínková N, Douglas AE, Roberts DM. (2012) *Acyrtosiphon pisum* AQP2: a multifunctional insect aquaglyceroporin. *Biochim Biophys Acta* 1818: 627-35.
143. Wang Y, Schulten K, Tajkhorshid E. (2005) What makes an aquaporin a glycerol channel? A comparative study of AqpZ and GlpF. *Structure* 13: 1107-1118.
144. Welter-Schultes F. (2012) European non-marine molluscs, a guide for species identification. Planet Poster Editions, Göttingen, s.615
145. Wiktor A (2004) Ślimaki lądowe Polski. Mantis, Olsztyn

146. Wree D, Wu B, Zeuthen T, Beitz E. (2010) Requirement for asparagine in the aquaporin NPA sequence signature motifs for cation exclusion. *FEBS J* 278: 740-748.
147. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. (2012) Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 18:134.
148. Yukutake Y, Yasui M. (2010) Review: Regulation of water permeability through aquaporin-4. *Neuroscience* 168: 885-891.
149. Zar JH. (1999) Biostatistical analysis. Wyd. 4 Prentice Hall, New Jersey.
150. Zardoya R, Ding X, Kitagawa Y, Chrispeels MJ. (2002) Origin of plant glycerol transporters by horizontal gene transfer and functional recruitment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 14893-14896.
151. Zhang W, Zitron E, Hömme M, Kihm L, Morath C, Scherer D, Hegge S, Thomas D, Schmitt CP, Zeier M, Katus H, Karle C, Schwenger V.(2007) Aquaporin-1 channel function is positively regulated by protein kinase C. *J Biol Chem* 282: 20933-20940.

8. ZAŁĄCZNIK



Ryc. 1Z. Sekwencja nukleotydowa i aminokwasowa HpAQP1

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 HpAQP2 TTGATCAAGTTGCCAGAAGCCGACCCCTGCAGAAAGTGCTGCTTCCTGGAAAATATTACAAGTTATTATATTAGTAGGAAGCTGGCGCTTCAACGTTGAAAA
 HpAQP2

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 HpAQP2 CTCAACCAGACTGAGCAGTGAGTGTGACGGAGGGTCGGGTGGGGTGAGCCAGTATTGGCCTTGACCGGGCAATGCATAGATCATGGAGGAGAAATGGG
 HpAQP2 M H K I M E E N V D

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 HpAQP2 ATGACCTGTTGACCTCAACCTGTGGCTGCTCTCGTGGCGGAGTTTACTGGGACGCTAGCAATCACATTGCTTGGATGTGGCGCTTGGTGAAGTGGAGC
 HpAQP2 D L L T S N L W L V A E F T G T L A I T T L L G C G G A W L T T G A

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 HpAQP2 CAATGTGGTGAGATAGCTCTGACTTTTGGCTCACAGTGGCCACTATGGCTGGGTGTTCAACCCATCTCGGGGGCTCACCTTCAATCCGGGGGTGACC
 HpAQP2 N V V Q I A L T F G L T V A T M A W V F N H I S G A H F N P A V T T

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 HpAQP2 ATCGCCAGTCTCTTCCACCGCGGGTCAGTATTATCAGGGGCGTCTCTACATCATTTACAGATAGCCGCCCTATATCCGGTCCGGTATTTCTGTACC
 HpAQP2 I A S L F T R R V S I I R G V L Y I I I I Q I A A A I S G S G I L Y R

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 HpAQP2 GCCTGACACCCAGAGGTACTCAGCAAAACCTAGGAGCCAACGAGTTGTCACTGAAATAAGCACAGCTCAAGGGGTTTGGAAATCGAGCTACTGATTACGTT
 HpAQP2 L T P R G T Q Q N L G A N E L S P E I S T A Q G F G I E L L I T F

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 HpAQP2 CTTTACATGCTGGCTGTTTCCGCTTCCGGGGATGAGAAGAGGTCGGATCTGAAGGGCTCAGCCCCCTTGACCATTTGGCCTGGCGTGGTCACTGCCAG
 HpAQP2 V Y M L A V S A S G D E K R S D L K G S A P L T I G L A V V T C Q

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 HpAQP2 CTGTTTGCATTCCTGTACACACGAGCAGGAATGAATCCGGCCCGCAGCTTTGGCCAGCTCTGATTGCTCGCTGCCGGAAGATCACTGGGTATTTCTGGC
 HpAQP2 L F A I P Y T R A G M N P A R S F G G A L I V A A W K D H W V F W L

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 HpAQP2 TTGGTCCACTGGTGGGCGCCACTCTGGCGGGCCTCGTATGAATACATTTTCGTTGCTGGCGCCACTTTCACGGGACTGAAGCAATGCTGCTGCAGAC
 HpAQP2 G P L V G A T L A G L L Y E Y I F A A G A T F T G L K Q C L L Q T

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
 HpAQP2 AAAGAGGCCAGGAAGCAACCGAATCAGAAAAGGCTCCGCTGGAGGAGGTAAAGGACGAAGTCATTGAGATTGATGAATCAAAAGTAGACGAGAAACAG
 HpAQP2 K R R R K Q P E S E K A P L E E V K D E V I E I D E S K V D E K Q

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
 HpAQP2 AGCGGCGATAGTCGGACATTTAAAGGAGACACGCAATGGACGATTCCAAGTGACAGAATCAATAGCAAGAATATTAATTTGGCTAAGGCCATAGAG
 HpAQP2 S G D P R D I I K G D T T M D D S K *

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 HpAQP2 GCGAGAAAGAAATTTTCAGCAGGTGATACCTATCGGTGGATTATGGAAGAAGGAAAGCACCAAAACGTTTGATCTGCTGCTCAAAACATTTTCCTTCTTCC
 HpAQP2

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
 HpAQP2 ACAATCTAAATTCATTCTCTTCAATTCAGTTAAATGTTGCGCCCAAGGAGACACCAATATATATGAACAAACACGAGCATTAACCTTCAAAATACATAA
 HpAQP2

1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 HpAQP2 ATCTGTTACATTAATATACATGCTATGAAAATGAGCCATATCATATAATCGTGCTTGGCTTGCAGCTGAGATAAATCCCGGCAGGAGAGTAAAGCCAT
 HpAQP2

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 HpAQP2 GCACATAATATACCTTTTAACTAAACCTTTAAGTATATATATATATAGTTACAAGAATGGTTGATGAGGATTTGTAAGTGGGGAGAAATGCAACACA
 HpAQP2

...
 HpAQP2 CAG
 HpAQP2

Ryc. 2Z Sekwencja nukleotydowa i aminokwasowa HpAQP2.

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 HpAQP3 CCATGGTCTCATGCACAGAACTTCTGGGCACCAAGAGCAAGTCGTTTGTCCGAGCAGTGTAGCTGAAGCTTTGGCACGGCCATGTTGGT
 HpAQP3 M V S C T E L L G T K E A K T S R F V R A V L A E A V G T A M L V
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 HpAQP3 CATCTTGGATGTGGTCTGTGCCACTTTAAACAAAGGACTACATCCGGGCGCGAAACAATGGCTGTGCCTTTCTTTGGTTTTCCTGGCAATG
 HpAQP3 I V G C G S V S T L N K G L H P G A E T M A V A F S F G F A I A M
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 HpAQP3 ATCATCTGGATGTGGACATATTAGTGGAGCACATGTGAATCCGTGTATCTATTGGCTTTCCTGGTGACAGGCCAGTCAGCTTGCTGAAGATATCT
 HpAQP3 I I W M E F G H I S G A H V N P C V S I G F L V T G H V S L L K T I C
 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 HpAQP3 GCTATATAAGCCAGGTGGCAGGTGCCATCGCAGGAGCTGGTCTACTGAAGCAATCATCCCTCCGGTGGCAAGGGAATCTGGGAACACACGCT
 HpAQP3 Y I I A Q V A G A I A G A G L K I I P S G W Q G N L G T T T L
 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 HpAQP3 CGATGAGAACTGACCATCTGGCAGGGTGTATTATCGAGGTCATAGCCCAATTCTGCCCTGGTCATGACAGTGTCCCGAGTTGTACCGCACTGAGGACT
 HpAQP3 D E N V T I W Q G V I I E V I A T F C L V M T V F A S C D R L R T
 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 HpAQP3 GACACAGCGGCTCCATTGCTCTAGCCATCGGCTTCTGTGTGACCGCATGATTACTTGGATGGGTACAACAGCGGAGGCAGCATGAACCCCGCAGAT
 HpAQP3 D H S G S I A L A I G F C V T A M I T W M G T T T G G S M N P A R S
 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 HpAQP3 CCCTGGGTCCCGCTGTGTCTGGCTCTGGAAACATCACTGGATCTACTGGCTTGTCCGATCGCTGGAGGCATCATTTCCCGCACTGGTGTACGAGCA
 HpAQP3 L G P A V V S G V W K H H W I Y W L A P I A G G I I A A L V Y E H
 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 HpAQP3 CATCTTCCCGAGCAGACGAAGGAGACCAACACGGAACTTAACACCTTCCAGTACAACAACCTGGAGATGCAGCGCAGCGGCTACCTGGACTTCACGCTG
 HpAQP3 I F A E Q T K E T N T E L N T F Q Y N N N L E M Q R S G Y L D F T L
 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 HpAQP3 GACATCCCTGGTCCAGGCAACGACAAAACCACGCCAACAGACTTCAACAAGGGTCGGAGATTCTCGGCTGCCTTCATCCTGAACGCTTTCACAGGA
 HpAQP3 D I P G P G N D K T T S P T D F N K G R R F S A A F I L N A F T R N
 910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
 HpAQP3 ACCGAGACCCCGGGCTCGACTAGCGAGGGCTGTAGCGCTGATGAGGGCGTGCAGTCGATGAGGAATCCTGTCTGTGATACCCCACTTGGTCG
 HpAQP3 R D R R A S T S E G L *
 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070
 HpAQP3 GAGTGTGTTTTATGTTCGGACCTATCAACATTTACAATCAGGGAAGGGCTATGATCTAGGGTAGTAGTTGAC
 HpAQP3

Ryc.3Z Sekwencja nukleotydowa i aminokwasowa HpAQP3.

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 HpAQP4 TACCAAGAAGTATATACACTTTGCACAAGCCCTGGCATTGGCCACATTTAAACAAAACATAANGGCTGTAATATGATTGACATTTTGGGATTTCCAGG
 HpAQP4 ~M~I~D~I~L~G~F~H~E~

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 HpAQP4 GATACGGACTGGAAAAATTGTCAAAGCGGTGTTGGCAGAGTTGTAGCTACTGCTATTTTGATCATCGCTGGCTGTGGGTCTTGTGTGACCATGGACGAA
 HpAQP4 ~I~R~T~G~K~F~V~K~A~V~L~A~E~F~V~A~T~A~I~L~I~I~A~C~C~G~S~C~V~T~M~D~E~

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 HpAQP4 GGGAAACCTCTTAGCACCTTGACAACATCGTTAACGTTGGGATGACCGTTGCCTTCATTGTGTATACCTTTAATCAGTGAGCGGAGCCACATTAATC
 HpAQP4 ~G~K~P~L~S~T~L~T~T~S~L~T~F~G~M~T~V~A~F~I~V~Y~T~F~N~H~V~S~G~A~H~I~N~P~

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 HpAQP4 CTGTGTGACGATGGGGTTTCTCATACAGGCCACACTAAAGTGGTTAAAACCATTCCTACACTGTTGCTCAGTGTGGTGGCGCTATCGCTGGCTCAGC
 HpAQP4 ~V~V~T~M~G~F~L~I~T~G~H~T~K~V~V~V~K~T~I~A~Y~T~V~A~Q~C~G~G~A~I~A~G~S~A~

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 HpAQP4 CGTCACTGTTACCTGGTGCCACCTGGTTGGAGGGGAACCATCGGGAGCACCGTGTTCCGAGAGGGTGAACCTCTTGGACAAGGCTTTGTCTAGAAGCC
 HpAQP4 ~V~I~W~Y~L~V~P~P~G~W~R~G~T~I~G~S~T~V~F~A~E~G~V~T~L~L~Q~G~F~V~I~E~A~

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 HpAQP4 ACCAGTACGTGTTTCTGATGTTGGGTGACTGGCAAGCGCAGACAATCATCGGACTGATCACGGGGGGTCTACCTCTCTCACTATAGGACTTGTGTCT
 HpAQP4 ~T~S~T~C~F~L~M~L~G~V~L~A~S~A~D~N~H~R~T~D~H~G~G~S~T~S~L~T~I~G~L~V~V~F~

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 HpAQP4 TCACGCAAAGTGCAATGGGCGGGAAAGCCAACTGGCTGCAGTATGAACCCAGCCCGCTCGCTGGGTCCGGCCGTGTTATCGGGAACTGGGCCAACCACTG
 HpAQP4 ~T~Q~S~S~A~W~A~G~K~P~T~G~C~S~M~N~P~A~R~S~L~G~P~A~V~L~S~G~T~W~A~N~H~W~

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 HpAQP4 GGTGTAATGGGCTGCTCCTGCATTTGGGTCAATACTAGGTTCCTTGTGTTTACCACCATGTTCTTGCTGAATCGCCACCAGAGGTCAGCACAGCATCCAG
 HpAQP4 ~V~Y~W~A~A~P~A~F~G~S~I~L~G~S~L~F~Y~H~H~V~L~A~E~S~P~P~E~V~S~T~S~I~Q~

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 HpAQP4 GGCACACCTTTGACTGACGTTTTCACACAGAGAGGCAGAGAAACGGCAACATCTAACGGAAAGGACTCCAGTTATTGACAAAAACCAGCAAACGATACC
 HpAQP4 ~G~T~P~L~T~D~V~S~H~R~E~A~E~K~R~Q~H~L~T~E~R~T~P~V~I~D~K~N~H~S~K~R~Y~Q~

910 920 930 940
 HpAQP4 AGAAACAAGGGTTTAGTAATCCTGCTATGGACTTAGTTCTTCGTGA
 HpAQP4 ~K~Q~G~F~S~N~P~A~M~D~L~V~S~S~*~

Ryc. 4Z Sekwencja nukleotydowa i aminokwasowa HpAQP4.

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 HpAQP5 C G A G A G G C A G T C G C A G G T T A T T A T T C G A C G T T A T C T T T T T C A T T A T T G C T A A A G C C A C C A A G C A G A G T T T G A T A T C T G G C C C T T G A C A C G G A A A C A G A
 HpAQP5

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 HpAQP5 A A C C A G A A A A C A G A A A C C A G G A C A G A T T G T T G C C T T A T A A A C G A A G T T A T A A T A A A C A G T A A T A T C T A C A C G C A G A A C A A T C A C A A C A A T C T T G G G
 HpAQP5

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 HpAQP5 C A A A G A A C A A T C T T T G A A C A T T C A T T T G C A A C T A T T G G A T T A C T G T T T T A A A C A A A G A A C C A G C G C A T C A A T C G A A C T A A C C A A C A A T G G A A G C C C T
 HpAQP5 M E A L

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 HpAQP5 C T T C A T T C A T A T T G C C A A C A A G C T G G A A G C C A T T C G C T T C G G C C A G A G A C C C T T C G G G A A G A T C G T C G A C C T G T C A G A G C T C A A A T C C G T G G A A C T G
 HpAQP5 F I H I A N K L E A I R F G R Q S P S G K I V D L S E L K S V E L

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 HpAQP5 T G G A G G G C G G T A T T T G C C A G T T C C T G G C T C A A G T G C T C T T C T G T C C T C G G A T G T G C C T C C G C C A T C G C C A T T T C G C A A C A A A C G A A T C T T C A G A C A
 HpAQP5 W R A V F A E F L A Q V L F L F L G C A S A I A I S A T N E S S D I

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 HpAQP5 T C T A T C T G G T G A A G A T C G C T C T A T C T T T C G G A C T G G C A A T C A T G G C G T G A T T C A A A T G T T G G A C A T G T C A G T G G A G G T C A C A T T A A C C C A G C G C T C
 HpAQP5 Y L V K I A L S F G L A I M A L I Q M F G H V S G G H I N P A V S

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 HpAQP5 G A T A G C A A T G G C T G T G G C C A T G A A C A T T C G G T T G T C A G A G C T G T G T T G T A C G T A A T C G C C C A G A T T C T T G G C C C A T C G T T G A G G A T T C C T C C T C A A A
 HpAQP5 I A M A V A M N I S V V R A V L Y V I A Q L G A I V N G A F L L K

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 HpAQP5 G G G T T G A C C C C A A C T C G G T T T C A T G A C A A C T T G G C G G T C A C T A A C C T G G G A C A C G G G T C A C T C A G G C T C A G G G A T T T G C G T G G A G C T G C T G C T G A C C T
 HpAQP5 G L T T P T R F H D N L A V T N L G H G V T Q A Q G F G V E L L L T F

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 HpAQP5 T C A C A T T G G T G A C G G T T A T T T T T G G A A C C A C T G A C C C A A C A G G C C A G C T T C G G T A G T C C G G C C C T T T G A T T G G C C T G A C G G T C A C T C T T G T G C A T T T
 HpAQP5 T L V T V I F G T T D P N R A S F G S P A L L I G L T V T L L G H L

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
 HpAQP5 G G C T G G C A T C A A C T A C A C G G G T C C A G C A T G A A T C C A T C C A G G T C C C T T G G A T C T G C T G T T G C T T C C A A C G C C T G G G A C A A T C A T T G G A T A T A C T G G G T A
 HpAQP5 A G I N Y T G S S M N P S R S L G S A V A S N A W D N H W I Y W V

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
 HpAQP5 G G T C C A A T C G C T G G C G G G T T C T C T C T G C C C T G T C A A G C T G A T C A A T C C A T C A G A G G C G T G C T G A A C G T G G A G G A G G C C A T C A A C A A C T G A
 HpAQP5 G P I A G G V L S A L V Y K L I I N P Y R G V L N V E E A I N K L K

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 HpAQP5 A G A A T G A C T T A C C A G C G T C T C A T T T T G A T G A T A T T A C A C T G A A G A C C G T T G A A T A G A C T C G G A T G A T A A C T G T T A G C G T T A C C A A G G A C T T T T T C A A G
 HpAQP5 N D L P A S H F D D I T L K T V E *

```

      1210      1220      1230      1240      1250      1260      1270      1280      1290      1300
HpAQP5  GAGGAAAAACAGCAACCAAAAGCGCCAGAAATAACGCACATGTAGAAATAAGCAAGCTTCCATTTGTTGTTAACTATTATACAGTATTACGTATGAG
HpAQP5

      1310      1320      1330      1340      1350      1360      1370      1380      1390      1400
HpAQP5  GTGATGAAGTCTTTGTGTACCTTCCCATCTCAGGTACCGTTGGAAACATGGAGGCTTGGAAAGAAGCTTAACGAAACCTATGTGCTCTGCAACCATC
HpAQP5

      1410      1420      1430      1440      1450      1460      1470      1480      1490      1500
HpAQP5  ACACCTGGAATCACTGAAACAAATACCAGAGTATTATGGTTGCGTCAGTATTGTGACCAGTGCACTCGCCTGATGGCCTGTTGGTCCCTGTTAGAAATTC
HpAQP5

      1510      1520      1530      1540      1550      1560      1570      1580      1590      1600
HpAQP5  TTTTGAGATGAATTTTTCGTAAACCAATATAATTCTAGTGGTTCTAGAAACGTTTCTATGAGACAAGGAGGCAAAATATTACCCTTATCTACCGAATA
HpAQP5

      1610      1620      1630      1640      1650      1660      1670      1680      1690      1700
HpAQP5  CCGAAGGGTCATGAGATTTTGGGCCAGTACCGTTCCCGAATGTCACAATGGCTTAGATATGTTGTCCCTTTTTTTAATCCGAGTCTGAGATATATCA
HpAQP5

      1710      1720      1730      1740      1750      1760      1770      1780      1790      1800
HpAQP5  GAAATGCAGTTAAATTTAACTATGGTGGCGCAATAAGCGAATGGTTAGAAAAATAGGGAGAAATATCATGGAAAGGTAAGATGGTAAATAAATAAGTCTCA
HpAQP5

      1810      1820      1830      1840      1850      1860      1870      1880      1890      1900
HpAQP5  ATAAATGGAAGAAAAAGACGGCAAAATAAAGAAGTTAGTTATGGAGTGACAAGATGTGACATAAAGCTATCTCAATCATCGAGAGACAAGATGATACATAAA
HpAQP5

      1910      1920      1930      1940      1950      1960      1970      1980      1990      2000
HpAQP5  AATGTCTCAATCATGGAGACTAAAGTTGACACTTTTTTCCCCCGTCTATTGTGTCTCCACATATGCGTCTGTTAATATTCCCTTGCTCATATATGGGAGATT
HpAQP5

      2010      2020      2030      2040      2050      2060      2070      2080      2090      2100
HpAQP5  ATCAACACATGTACACGTGTTAATCTTGTAGGGTCGCTATATATGTGTGGCTTCTTCCCTTATCCAGGGGTGGTTTAGAAATACAAGATGGTAATGATGA
HpAQP5

      2110      2120      2130      2140      2150      2160      2170      2180      2190      2200
HpAQP5  AATGTGTTGGTGATACCTGATGCTGATGCTGATGTTTCATTAACGGCGATGTTGATGATAGAAATGTTGATGATGAAGATGTCGATGGTGAAAAATATTGATGAT
HpAQP5

      2210      2220      2230      2240      2250      2260      2270
HpAQP5  GATATTAATAATAATGATGATTATAATCATGACCTATGTCGCAAAACGACAAATAATAAACAGCATATTCACACC
HpAQP5

```

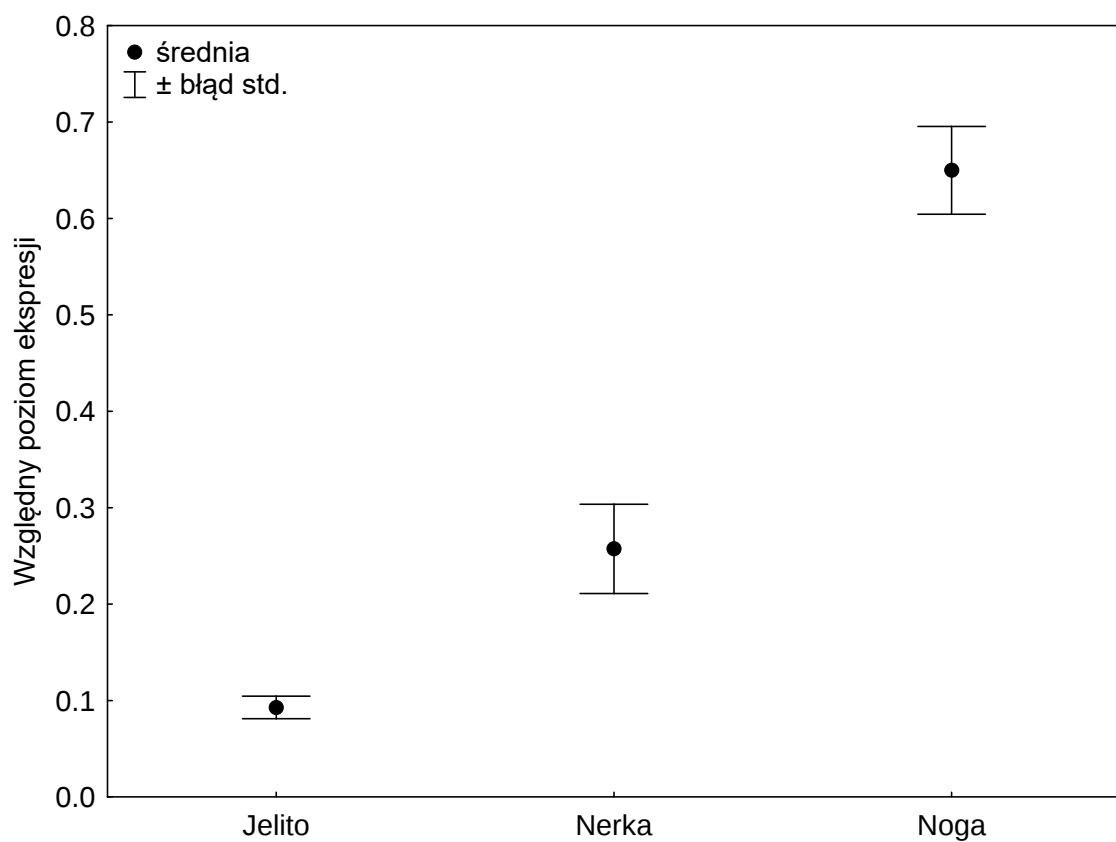
Ryc. 5Z Sekwencja nukleotydowa i aminokwasowa HpAQP5.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
HpAQF6	G	T	T	T	G	T	A	T	T	G
HpAQF6	T	T	G	T	T	G	T	T	G	T
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
HpAQF6	A	A	C	T	G	T	A	T	T	G
HpAQF6	T	T	C	C	T	T	C	T	T	C
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
HpAQF6	C	T	G	A	G	T	C	T	A	C
HpAQF6	T	C	A	C	T	T	T	T	T	T
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
HpAQF6	C	C	C	C	G	G	C	T	G	G
HpAQF6	T	G	G	C	T	G	G	C	T	G
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
HpAQF6	A	C	T	T	G	C	C	G	G	T
HpAQF6	T	T	G	C	C	G	G	T	T	G
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
HpAQF6	G	C	A	T	C	C	A	T	C	C
HpAQF6	A	T	C	C	A	T	C	C	A	T
	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
HpAQF6	A	C	A	T	C	C	A	T	C	C
HpAQF6	T	T	G	C	C	G	G	T	T	G
	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
HpAQF6	A	G	A	C	C	C	G	A	C	C
HpAQF6	T	T	G	C	C	G	G	T	T	G
	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
HpAQF6	C	C	A	G	C	A	T	C	C	A
HpAQF6	T	T	G	C	C	G	G	T	T	G
	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
HpAQF6	G	T	C	C	C	A	A	G	T	C
HpAQF6	T	T	G	C	C	G	G	T	T	G
	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
HpAQF6	A	C	T	A	T	C	C	A	T	C
HpAQF6	T	T	G	C	C	G	G	T	T	G
	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
HpAQF6	T	T	T	G	C	C	A	C	C	T
HpAQF6	T	T	G	C	C	A	C	C	T	T
	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
HpAQF6	G	G	G	T	A	C	T	G	G	C
HpAQF6	T	T	G	C	C	G	G	T	T	G
	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
HpAQF6	A	C	T	T	G	C	C	A	A	G
HpAQF6	T	T	G	C	C	A	A	G	T	T
	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500
HpAQF6	G	A	G	A	C	T	A	C	C	A
HpAQF6	T	T	G	C	C	A	A	G	T	T
	1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580	1590	1600
HpAQF6	C	T	G	G	T	T	T	G	G	C
HpAQF6	T	T	G	G	C	A	T	T	T	G
	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690	1700
HpAQF6	G	G	A	C	A	T	T	G	A	C
HpAQF6	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C
	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800
HpAQF6	A	T	A	A	A	A	T	T	G	A
HpAQF6	T	T	G	A	T	T	G	A	T	T
HpAQF6	A	A	T	A	T	A	G			
HpAQF6	T	T	A	T	A	G				

Ryc. 6Z Sekwencja nukleotydowa i aminokwasowa HpAQF6.

Tab. 1Z. HpAQP1. Wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) wraz z testem *post hoc* Tukeya RiR. Wartości w tabeli przedstawiają *p* (poziom istotności α)

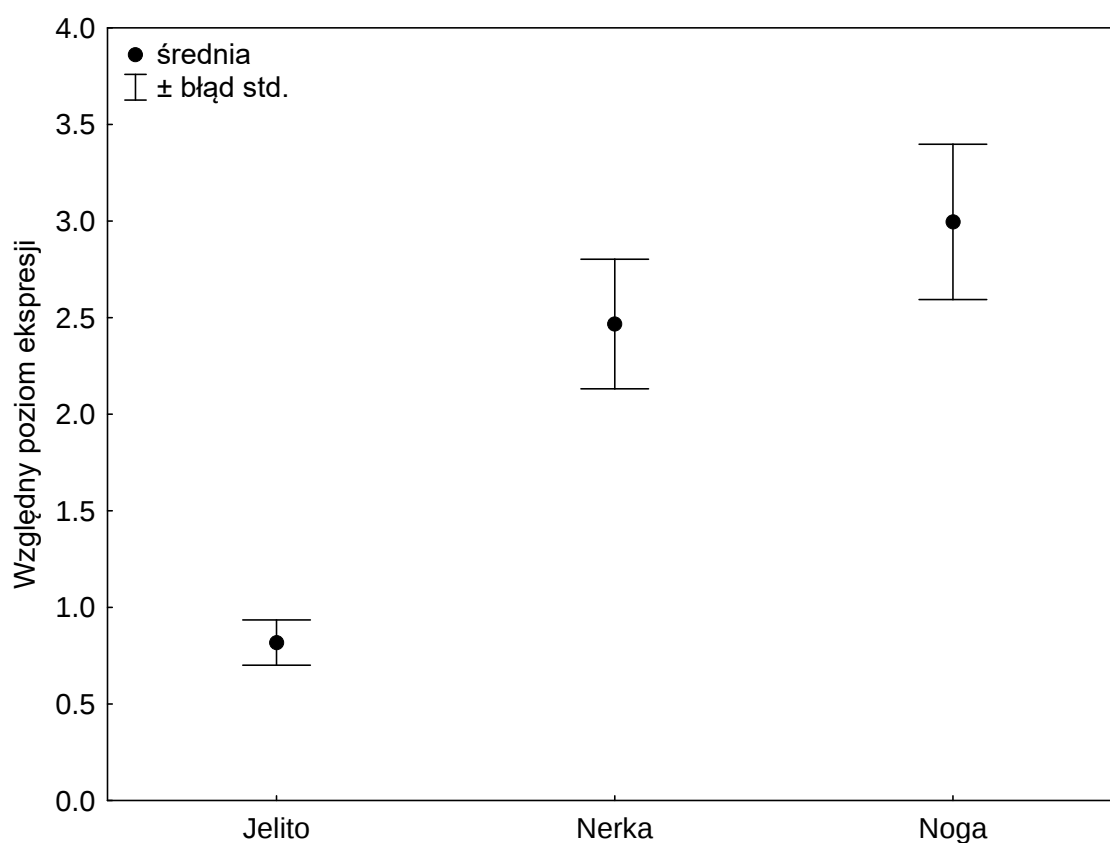
Tkanka	Jelito	Nerka	Noga
ANOVA $F_{(2, 11)} = 63,99$, $p = 0,000001$			
Jelito	-		
Nerka	0,03	-	
Noga	0,0002	0,0002	-



Ryc. 7Z. HpAQP1. Wykres, zgodny z testem ANOVA (Tab. 1Z) obrazujący różnicę w średnim, względnym poziomie ekspresji genów pomiędzy poszczególnymi tkankami.

Tab. 2Z. HpAQP2. Wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) wraz z testem *post hoc* Tukeya RiR. Wartości w tabeli przedstawiają *p* (poziom istotności α)

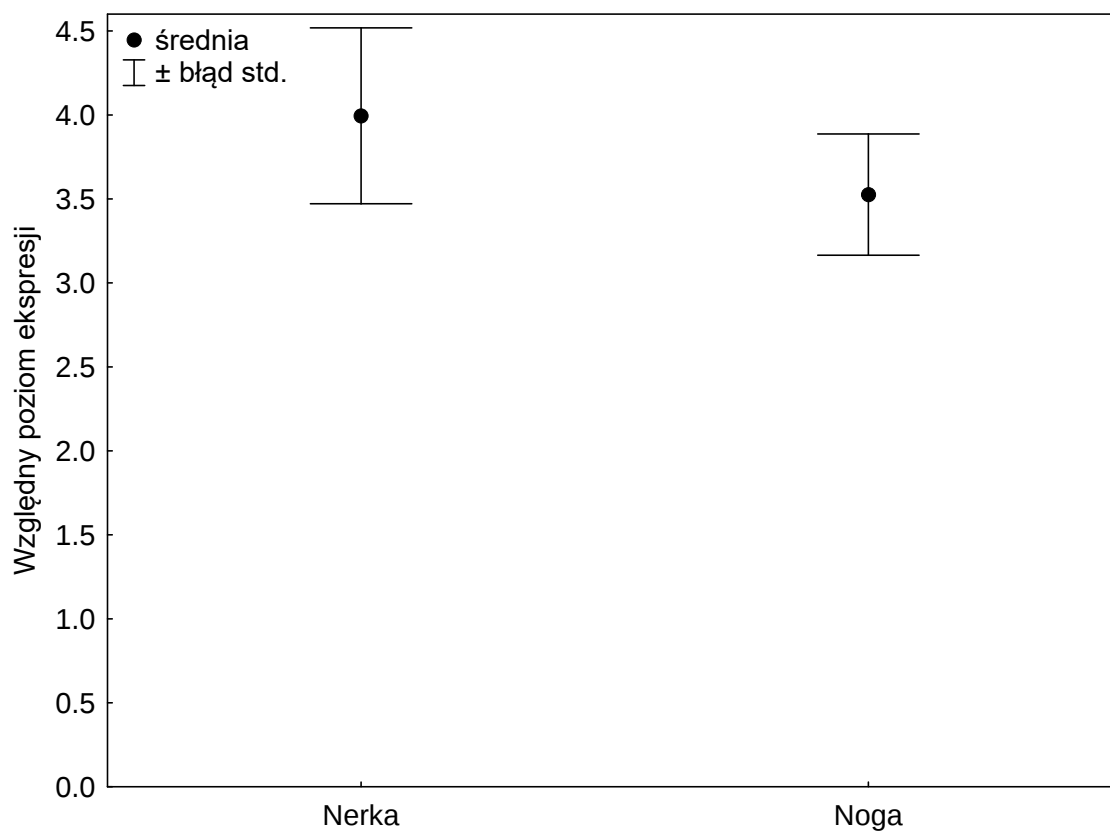
Tkanka	Jelito	Nerka	Noga
ANOVA $F_{(2, 12)} = 13,44$, $p = 0,0009$			
Jelito	-		
Nerka	0,007	-	
Noga	0,001	0,47	-



Ryc. 8Z. HpAQP2. Wykres, zgodny z testem ANOVA (Tab. 2Z) obrazujący różnicę w średnim, względnym poziomie ekspresji genów pomiędzy poszczególnymi tkankami

Tab. 3Z. HpAQP3. Wynik jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA)

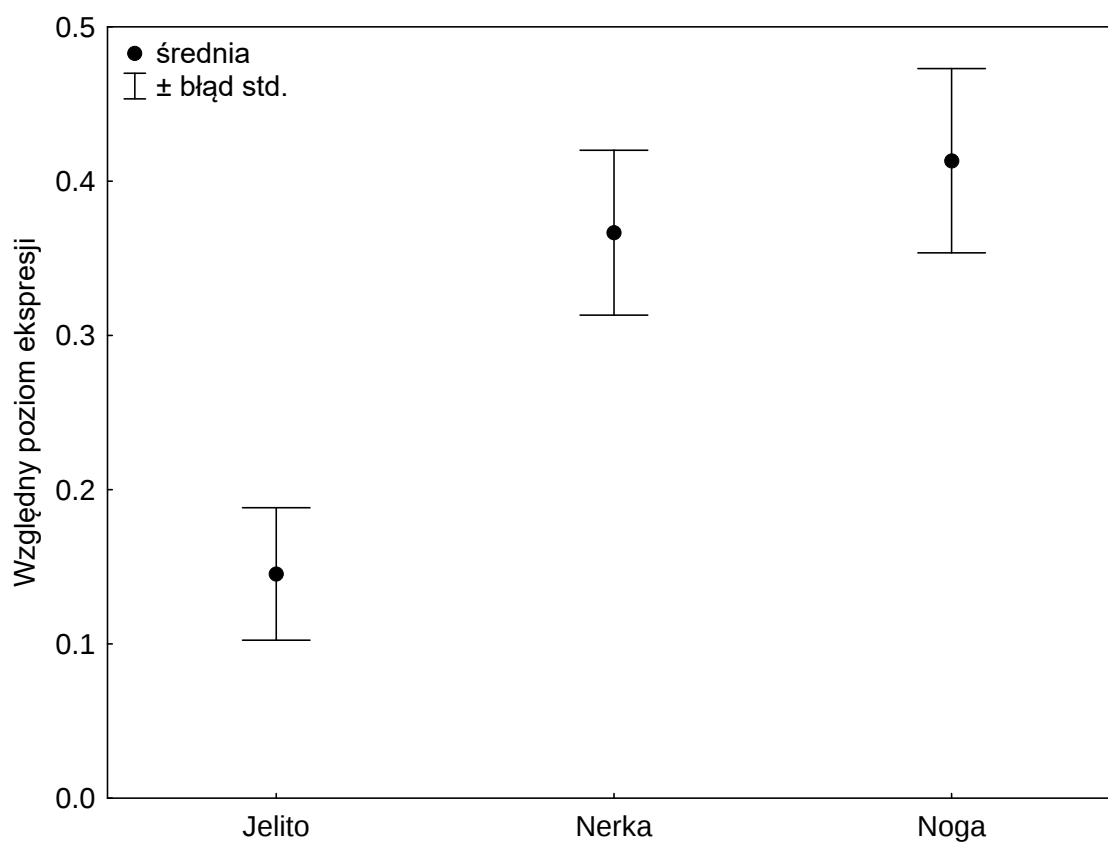
ANOVA $F_{(1, 7)} = 0,58$, $p = 0,47$



Ryc. 9Z. HpAQP3. Wykres, zgodny z testem ANOVA (Tab. 3Z) obrazujący brak różnic w średnim, względnym poziomie ekspresji genów pomiędzy poszczególnymi tkankami

Tab. 4Z. HpAQP4. Wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) wraz z testem *post hoc* Tukeya RiR. Wartości w tabeli przedstawiają *p* (poziom istotności α)

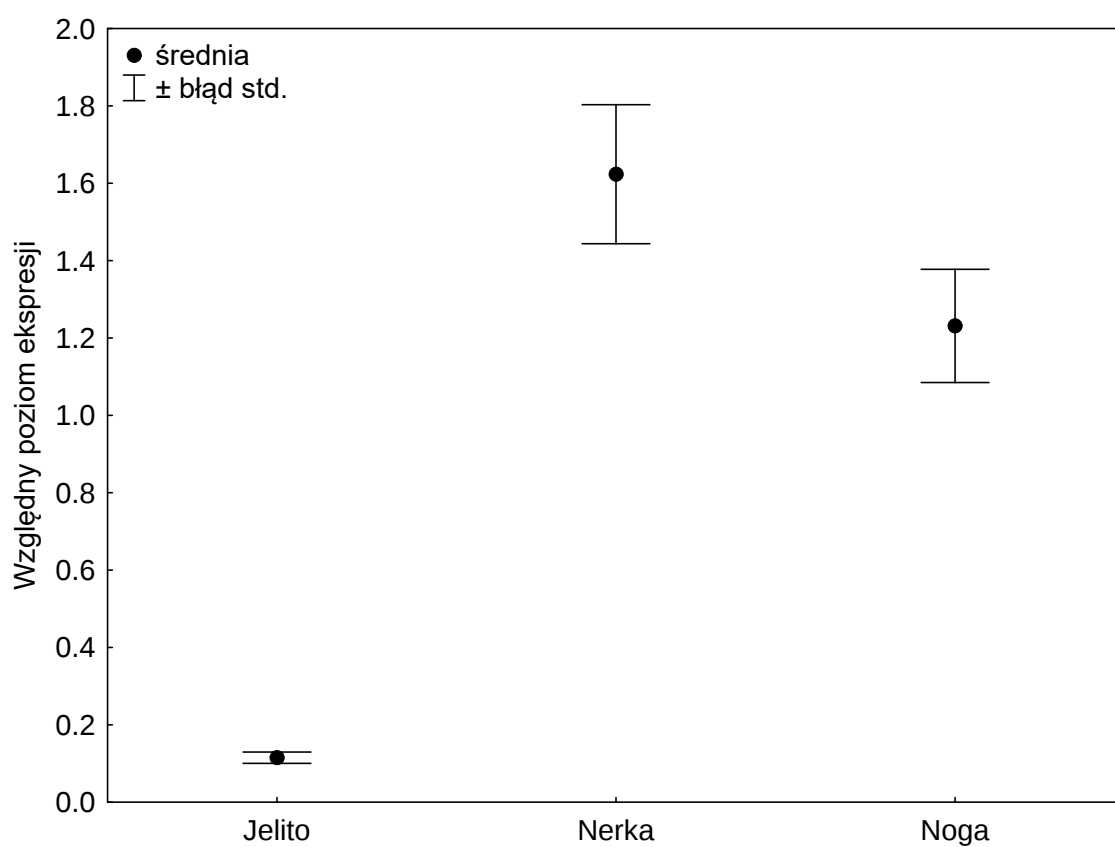
Tkanka	Jelito	Nerka	Noga
ANOVA $F_{(2, 12)} = 13,12$, $p = 0,002$			
Jelito	-		
Nerka	0,007	-	
Noga	0,003	0,76	-



Ryc. 10Z. HpAQP4. Wykres, zgodny z testem ANOVA (Tab. 4Z) obrazujący różnicę w średnim, względnym poziomie ekspresji genów pomiędzy poszczególnymi tkankami

Tab. 5Z. HpAQP5. Wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) wraz z testem post hoc Tukeya RiR. Wartości w tabeli przedstawiają p (poziom istotności α)

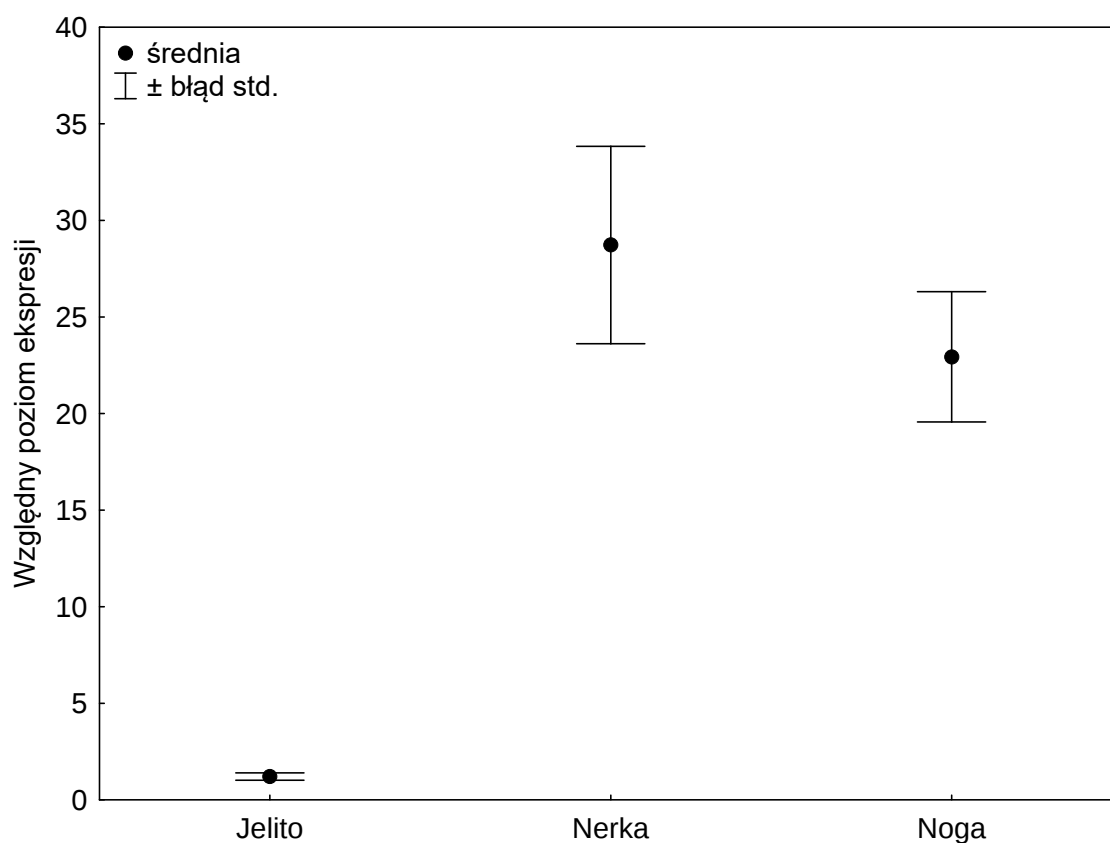
Tkanka	Jelito	Nerka	Noga
ANOVA $F_{(2, 12)} = 30,30$, $p = 0,00006$			
Jelito	-		
Nerka	0,0002	-	
Noga	0,0006	0,15	-



Ryc. 11Z. HpAQP5. Wykres, zgodny z testem ANOVA (Tab. 5Z) obrazujący różnicę w średnim, względnym poziomie ekspresji genów pomiędzy poszczególnymi tkankami

Tab. 6Z. HpAQP6. Wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) wraz z testem post hoc Tukeya RiR .Wartości w tabeli przedstawiają p (poziom istotności α)

Tkanka	Jelito	Nerka	Noga
ANOVA $F_{(2, 12)} = 20,04$, $p = 0,0002$			
Jelito	-		
Nerka	0,0004	-	
Noga	0,001	0,47	-



Ryc. 12Z. HpAQP6. Wykres, zgodny z testem ANOVA (Tab. 6Z) obrazujący różnicę w średnim, względnym poziomie ekspresji genów pomiędzy poszczególnymi tkankami

Tab.7Z Wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) zmian poziomu stężenia glicerolu w pożywce pochodowlanej. Tabela przedstawia test *post hoc* Tukeya RiR w odniesieniu do pYX142. Wartości w tabeli przedstawiają *p* (poziom istotności α)

ANOVA $F_{(6, 14)} = 16,82, p < 0,001$	
akwaporyny	pYX142
HpAQP1	0,26
HpAQP2	0,99
HpAQP3	0,004
HpAQP4	0,001
HpAQP5	0,63
HpAQP6	0,99

Tab.8Z Wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) zmian poziomu ekspresji genu *HpAQP1* w jelicie, nerce oraz nodze wraz z testem post hoc Tukeya RiR. Wartości w tabeli przedstawiają *p* (poziom istotności α)

Jelito

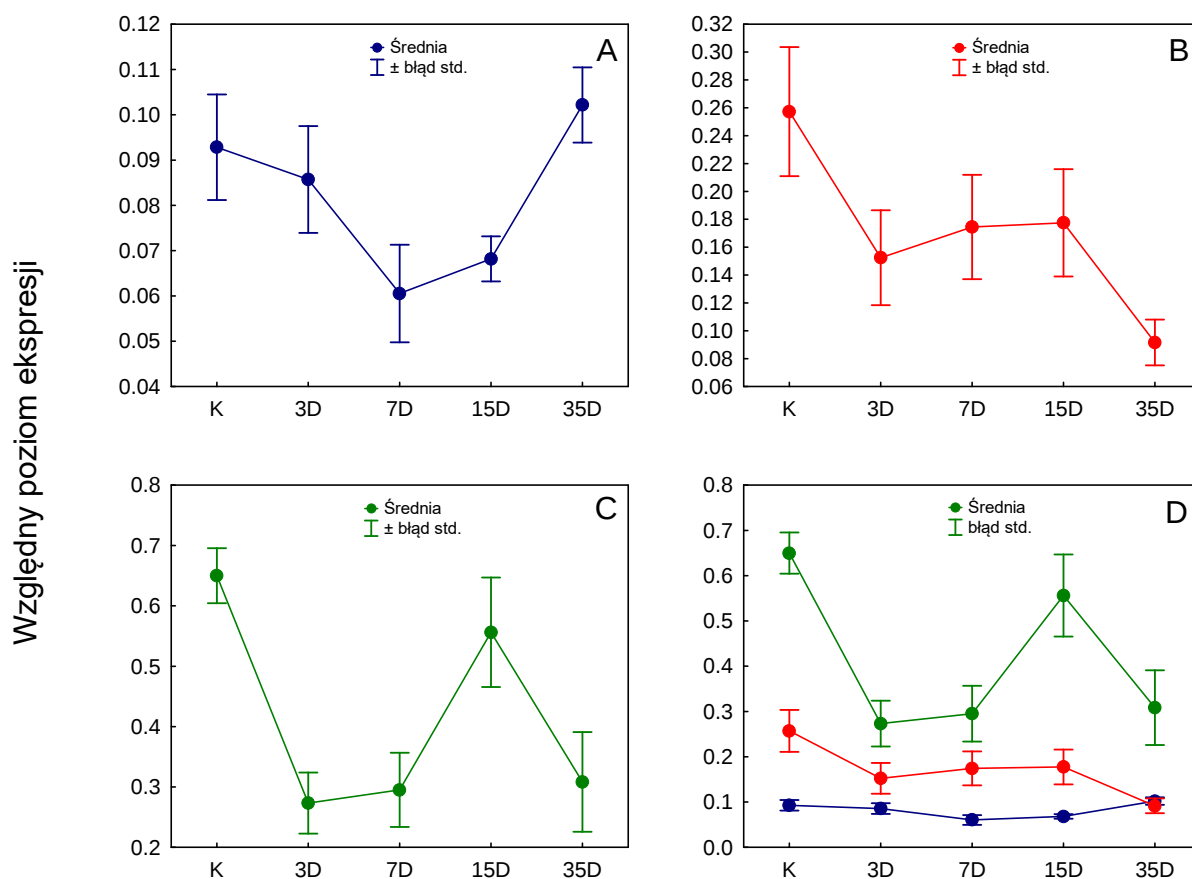
ANOVA $F_{(4, 20)} = 2,94, p = 0,04$					
Czas	K	3 dzień	7 dzień	15 dzień	35 dzień
K	-				
3 dzień	0,99	-			
7 dzień	0,13	0,28	-		
15 dzień	0,54	0,8	0,87	-	
35 dzień	0,97	0,84	0,05	0,28	-

Nerka

ANOVA $F_{(4, 20)} = 3,05, p = 0,04$					
Czas	K	3 dzień	7 dzień	15 dzień	35 dzień
K	-				
3 dzień	0,36	-			
7 dzień	0,64	0,97	-		
15 dzień	0,7	0,97	1,0	-	
35 dzień	0,02	0,52	0,2	0,22	-

Noga

ANOVA $F_{(4, 20)} = 5,5, p = 0,004$					
Czas	K	3 dzień	7 dzień	15 dzień	35 dzień
K	-				
3 dzień	0,02	-			
7 dzień	0,02	1,0	-		
15 dzień	0,93	0,08	0,12	-	
35 dzień	0,03	1,0	1,0	0,214	-



Ryc. 13Z. Zmiany poziomu ekspresji genu *HpAQP1* (por. Tab. 8Z) w trakcie zapadania ślimaka w stan estywacji w **(A)** jelicie **(B)** nerce **(C)** nodze oraz **(D)** we wszystkich trzech badanych tkankach

Tab.9Z Wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) zmian poziomu ekspresji genu *HpAQP2* w jelicie, nerce oraz nodze wraz z testem *post hoc* Tukeya RiR. Wartości w tabeli przedstawiają *p* (poziom istotności α)

Jelito

ANOVA $F_{(4, 20)} = 8,58$, $p = 0,0004$

Czas	K	3 dzień	7 dzień	15 dzień	35 dzień
K	-				
3 dzień	0,0005	-			
7 dzień	0,09	0,22	-		
15 dzień	0,09	0,13	1,0	-	
35 dzień	0,98	0,001	0,23	0,24	-

Nerka

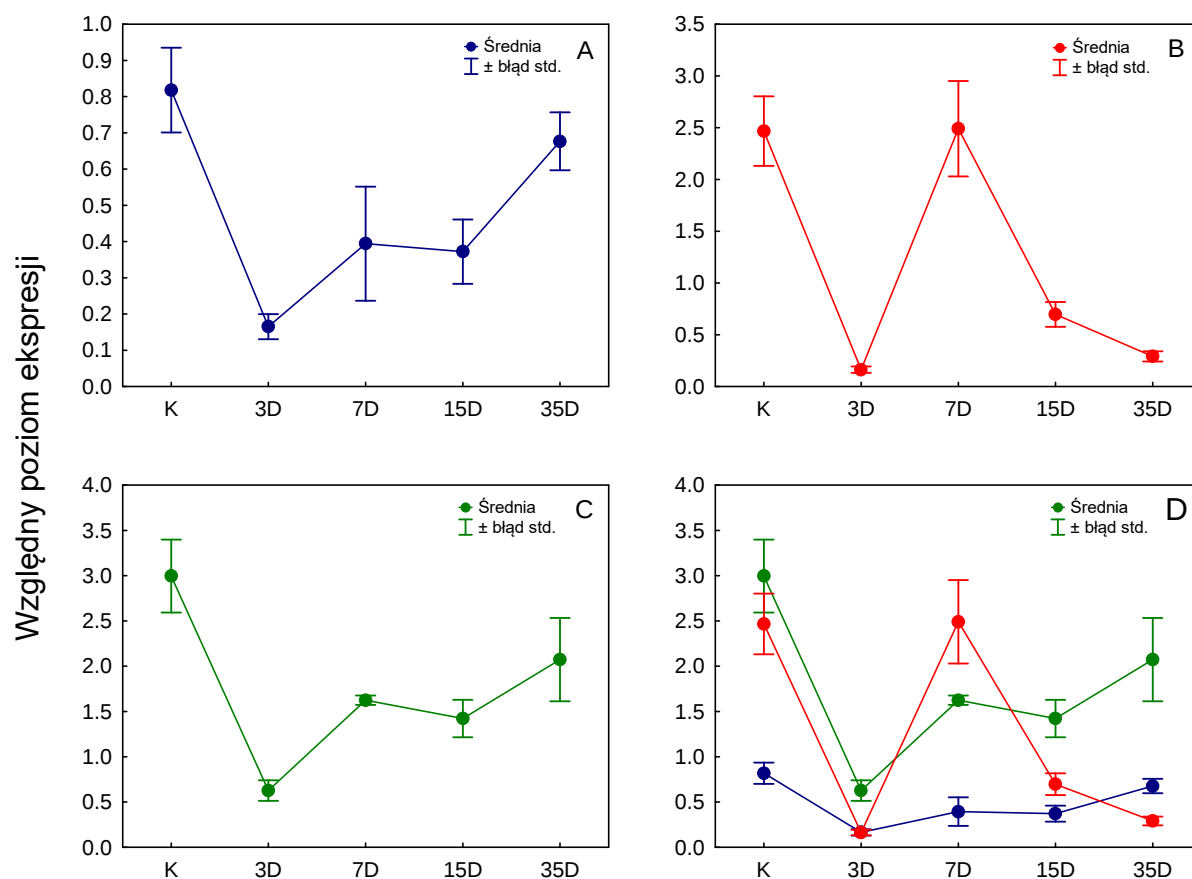
ANOVA $F_{(4, 20)} = 52,40$, $p = 0,000001$

Czas	K	3 dzień	7 dzień	15 dzień	35 dzień
K	-				
3 dzień	0,0001	-			
7 dzień	1,0	0,0001	-		
15 dzień	0,0008	0,0004	0,001	-	
35 dzień	0,0001	0,14	0,0001	0,01	-

Noga

ANOVA $F_{(4, 20)} = 10,41$, $p = 0,0002$

Czas	K	3 dzień	7 dzień	15 dzień	35 dzień
K	-				
3 dzień	0,0002	-			
7 dzień	0,19	0,01	-		
15 dzień	0,06	0,04	0,96	-	
35 dzień	0,36	0,002	0,98	0,75	-



Ryc. 14Z. Zmiany poziomu ekspresji genu *HpAQP2* (por. Tab. 9Z) w trakcie zapadania ślimaka w stan estywacji w (A) jelicie (B) nerce (C) nodze oraz (D) we wszystkich trzech badanych tkankach

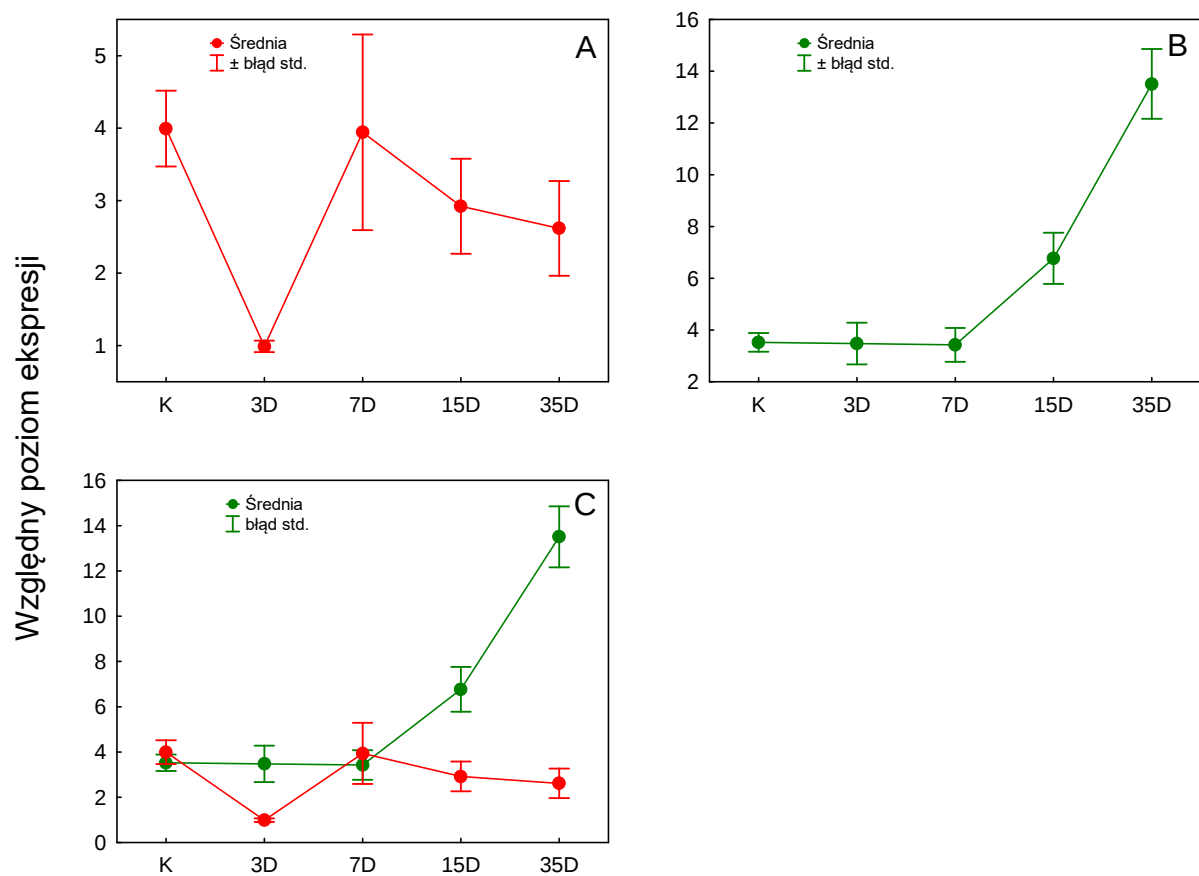
Tab.10Z Wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) zmian poziomu ekspresji genu *HpAQP3* w nerce oraz nodze wraz z testem *post hoc* Tukeya RiR. Wartości w tabeli przedstawiają *p* (poziom istotności α)

Nerka

ANOVA $F_{(4, 20)} = 6,18$, $p = 0,003$					
Czas	K	3 dzień	7 dzień	15 dzień	35 dzień
K	-				
3 dzień	0,003	-			
7 dzień	0,99	0,008	-		
15 dzień	0,72	0,03	0,94	-	
35 dzień	0,6	0,07	0,87	1,0	-

Noga

ANOVA $F_{(4, 20)} = 5,69$, $p = 0,003$					
Czas	K	3 dzień	7 dzień	15 dzień	35 dzień
K	-				
3 dzień	0,93	-			
7 dzień	1,0	0,98	-		
15 dzień	0,48	0,13	0,3	-	
35 dzień	0,02	0,003	0,01	0,42	-



Ryc. 15Z. Zmiany poziomu ekspresji genu *HpAQP3* (por. Tab. 10Z) w trakcie zapadania ślimaka w stan estywacji w (A) nerce (B) nodze oraz (B) w dwóch badanych tkankach

Tab.11Z Wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) zmian poziomu ekspresji genu *HpAQP4* w jelicie, nerce oraz nodze wraz z testem *post hoc* Tukeya RiR. Wartości w tabeli przedstawiają *p* (poziom istotności α)

Jelito

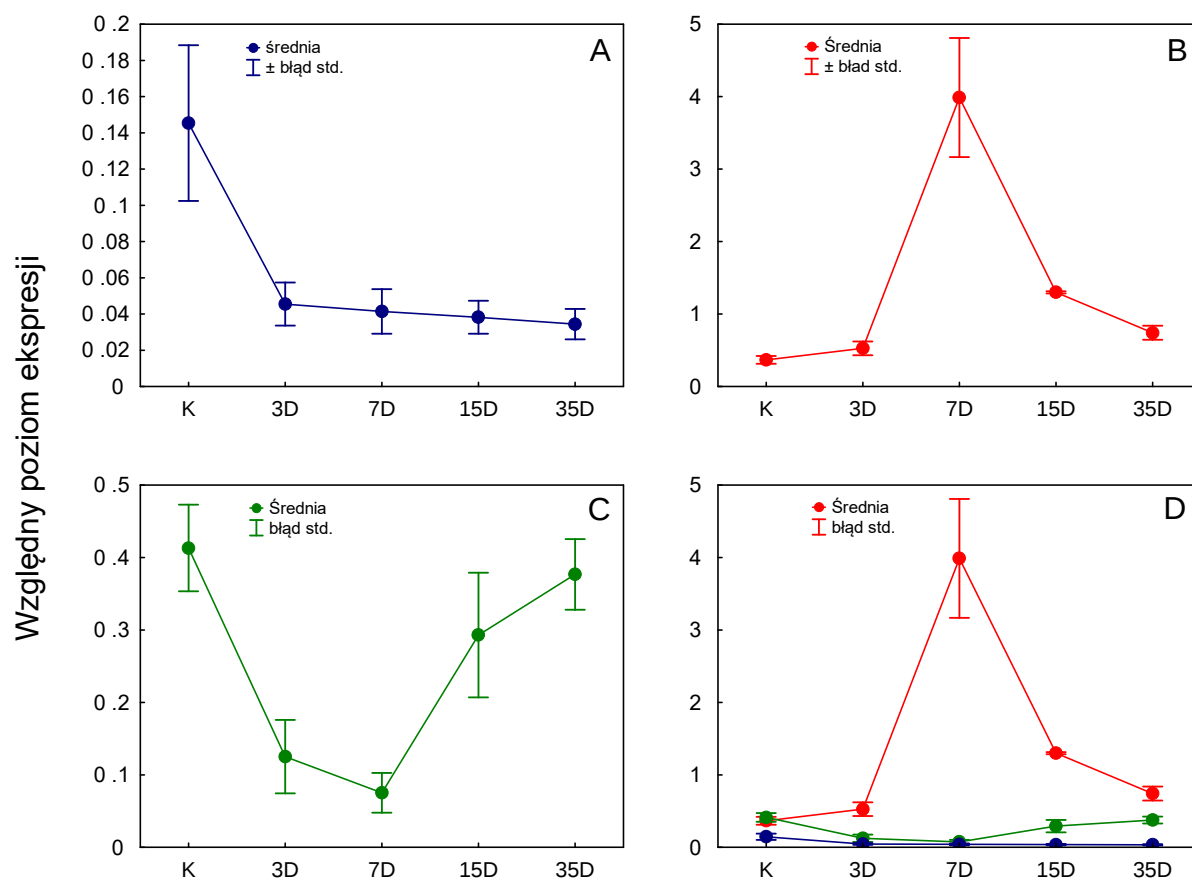
ANOVA $F_{(4, 20)} = 4,76$, $p = 0,01$					
Czas	K	3 dzień	7 dzień	15 dzień	35 dzień
K	-				
3 dzień	0,04	-			
7 dzień	0,03	1,0	-		
15 dzień	0,03	1,0	1,0	-	
35 dzień	0,03	0,99	1,0	1,0	-

Nerka

ANOVA $F_{(4, 20)} = 32$, $p = 0,000001$					
Czas	K	3 dzień	7 dzień	15 dzień	35 dzień
K	-				
3 dzień	0,65	-			
7 dzień	0,0001	0,0001	-		
15 dzień	0,0005	0,006	0,003	-	
35 dzień	0,06	0,49	0,0001	0,13	-

Noga

ANOVA $F_{(4, 20)} = 8,44$, $p = 0,0006$					
Czas	K	3 dzień	7 dzień	15 dzień	35 dzień
K	-				
3 dzień	0,03	-			
7 dzień	0,002	0,75	-		
15 dzień	0,82	0,18	0,01	-	
35 dzień	1,0	0,06	0,003	0,90	-



Ryc. 16Z. Zmiany poziomu ekspresji genu *HpAQP4* (por. Tab. 11Z) w trakcie zapadania ślimaka w stan estywacji w (A) jelicie (B) nerce (C) nodze oraz (D) we wszystkich trzech badanych tkankach

Tab.12Z Wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) zmian poziomu ekspresji genu *HpAQP5* w jelicie, nerce oraz nodze wraz z testem *post hoc* Tukeya RiR. Wartości w tabeli przedstawiają *p* (poziom istotności α)

Jelito

ANOVA $F_{(4, 20)} = 0,89$, $p = 0,49$

Nerka

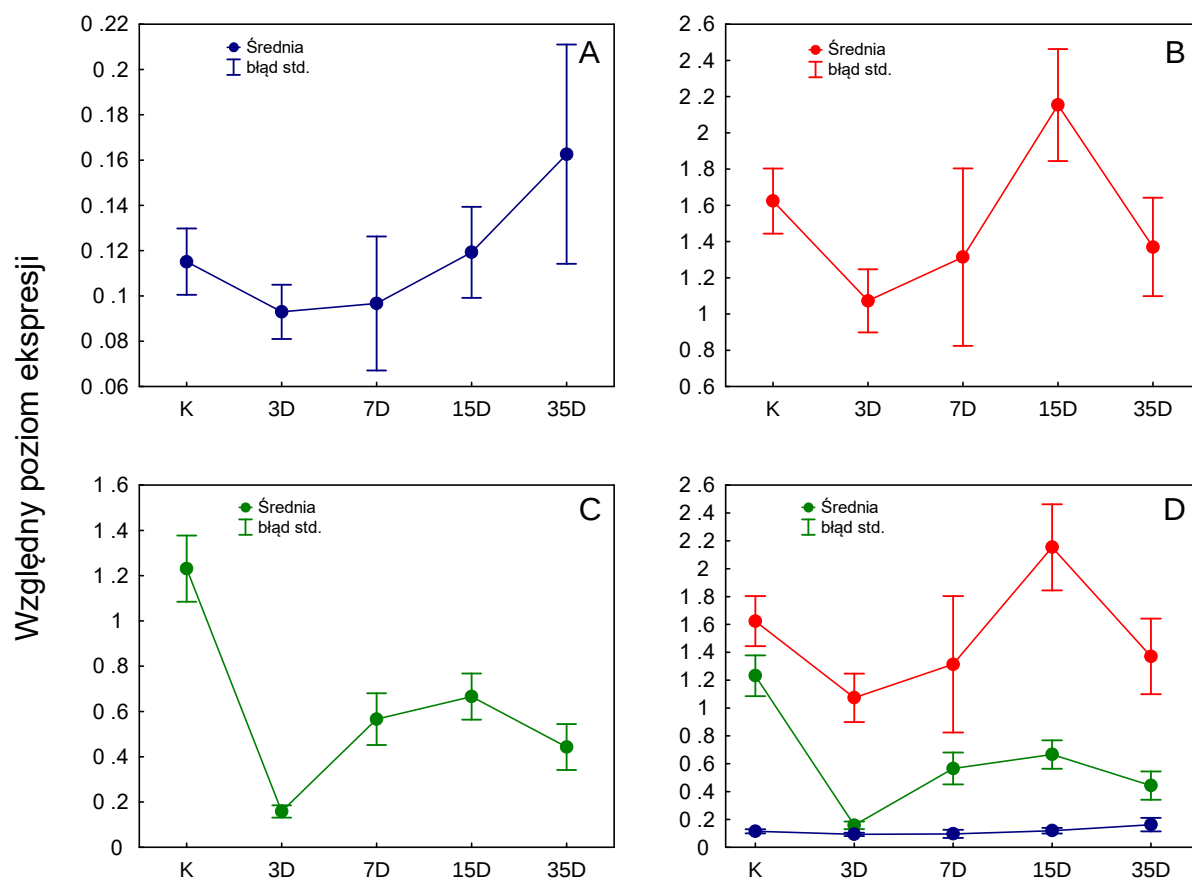
ANOVA $F_{(4, 20)} = 4,03$, $p = 0,02$

Czas	K	3 dzień	7 dzień	15 dzień	35 dzień
K	-				
3 dzień	0,55	-			
7 dzień	0,33	0,98	-		
15 dzień	0,57	0,04	0,02	-	
35 dzień	0,97	0,98	0,76	0,3	-

Noga

ANOVA $F_{(4, 20)} = 14,64$, $p = 0,000006$

Czas	K	3 dzień	7 dzień	15 dzień	35 dzień
K	-				
3 dzień	0,0001	-			
7 dzień	0,06	0,002	-		
15 dzień	0,14	0,0004	0,97	-	
35 dzień	0,003	0,01	0,8	0,4	-



Ryc. 17Z. Zmiany poziomu ekspresji genu *HpAQP5* (por. Tab. 12Z) w trakcie zapadania ślimaka w stan estywacji w (A) jelicie [brak istotności statystycznej] (B) nerce (C) nodze oraz (D) we wszystkich trzech badanych tkankach

Tab.13Z Wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) zmian poziomu ekspresji genu *HpAQP6* w jelicie, nerce oraz nodze wraz z testem *post hoc* Tukeya RiR. Wartości w tabeli przedstawiają *p* (poziom istotności α)

Jelito

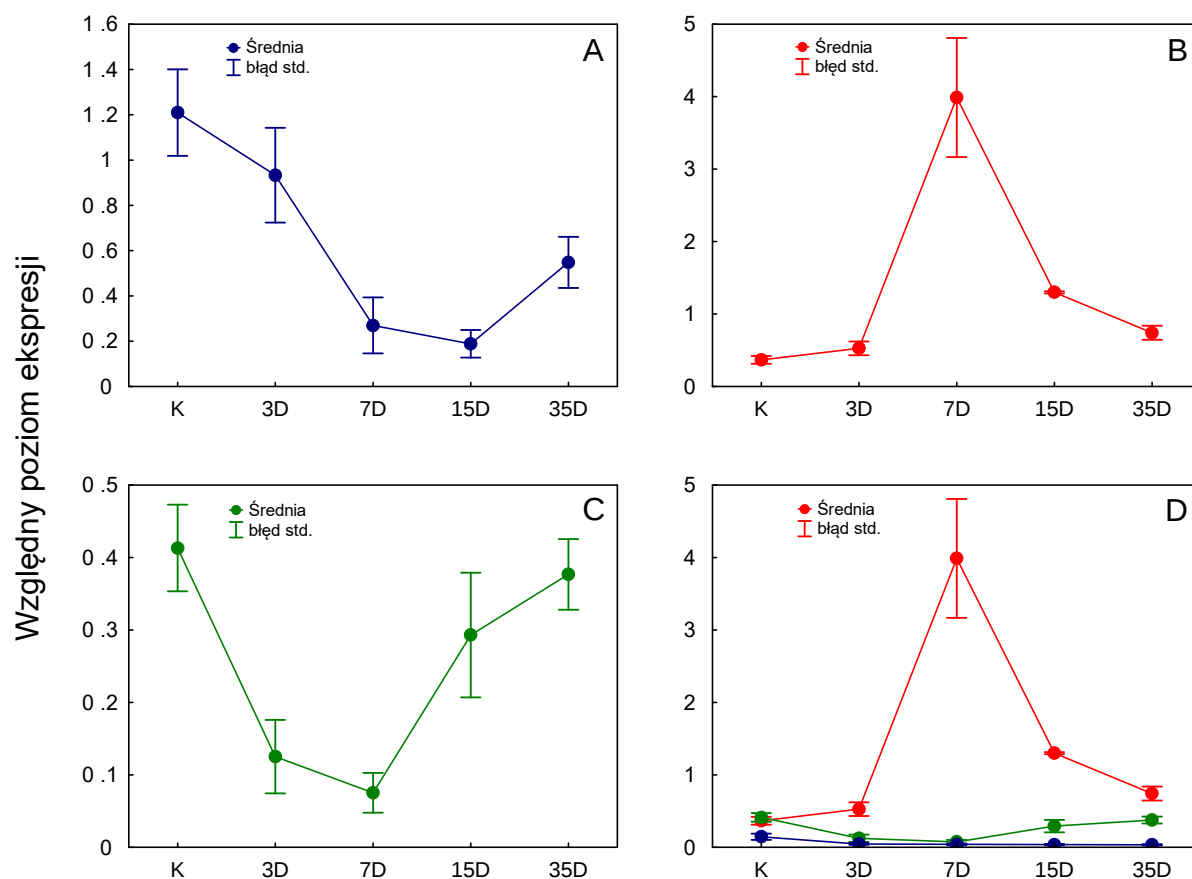
ANOVA $F_{(4, 20)} = 7,55, p = 0,0008$					
Czas	K	3 dzień	7 dzień	15 dzień	35 dzień
K	-				
3 dzień	0,20	-			
7 dzień	0,0005	0,008	-		
15 dzień	0,0001	0,002	0,72	-	
35 dzień	0,005	0,09	0,23	0,1	-

Nerka

ANOVA $F_{(4, 20)} = 83,54, p = 0,000001$					
Czas	K	3 dzień	7 dzień	15 dzień	35 dzień
K	-				
3 dzień	0,0001	-			
7 dzień	0,0001	0,2	-		
15 dzień	0,0001	0,41	0,99	-	
35 dzień	0,0001	0,94	0,65	0,89	-

Noga

ANOVA $F_{(4, 20)} = 20,67, p = 0,000002$					
Czas	K	3 dzień	7 dzień	15 dzień	35 dzień
K	-				
3 dzień	1,0	-			
7 dzień	0,0002	0,004	-		
15 dzień	0,43	0,51	0,009	-	
35 dzień	0,04	0,06	0,0001	0,002	-



Ryc. 18Z. Zmiany poziomu ekspresji genu *HpAQP6* (por. Tab. 13Z) w trakcie zapadania ślimaka w stan estywacji w (A) jelcie (B) nerce (C) nodze oraz (D) we wszystkich trzech badanych tkankach