



dr hab. Anna Nowakowska
Zakład Fizjologii Zwierząt
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
ul. Lwowska 1
87-100 Toruń
e-mail: noann@umk.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Ewy Kosickiej zatytułowanej
„Akwaporyny ślimaka winniczka *Helix pomatia* L. – identyfikacja,
charakterystyka i znaczenie w procesie zapadania w stan estywacji”**

Formalną podstawą wykonania recenzji było pismo przewodnie i umowa na wniosek
Dziekana Wydziału Biologii UAM w Poznaniu z dnia 8.11.2018r.

Opis ogólny

Oceniana rozprawa doktorska powstała w Zakładzie Biologii Komórki Wydziału
Biologii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu, pod kierunkiem prof. UAM dr hab.
Andrzeja Lesickiego - promotora oraz dr Joanny Pieńkowskiej - promotora pomocniczego.

W ocenie pracy naukowej najważniejszy jest podjęty problem badawczy, jego
oryginalność oraz sposób rozwiązywania postawionych hipotez. Rozprawa dotyczy niezwykle
interesującego zagadnienia adaptacji ślimaków lądowych do ekstremalnych warunków
środowiska, szczególnie wysokiej temperatury, która wywołuje stan estywacji. Ślimaki
lądowe wykazują ogromną tolerancję odwodnienia, które prowadzi do redukcji objętości
hemolimfy, a w konsekwencji do zmniejszenia częstotliwości skurczów serca i mniejszego
zużycia tlenu. Niezależnie od czasu trwania estywacji ślimaki są zdolne do wznowienia
aktywności w ciągu kilku minut, gdy wzrośnie wilgotność środowiska. Pomimo coraz szerszej
wiedzy na temat zmian tempa metabolizmu i estywacji ślimaków lądowych, wciąż brakuje
przekonujących dowodów na to, że istnieją u nich kanały błonowe o charakterze akwaporyn,
które mogą mieć kluczowe znaczenie w dystrybucji wody podczas zapadania, jak i

wychodzenia z tego stanu. Biorąc pod uwagę fakt, że odwodnienie towarzyszy zarówno estywacji, jak i odrętwieniu zimowemu, ślimaki muszą mieć sprawny mechanizm kontrolujący ich uwodnienie w różnych warunkach środowiskowych.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska ma charakter monografii typowy dla prac z zakresu nauk biologicznych. Składa się z 9 rozdziałów oraz załącznika zawierającego 18 rycin i 13 tabel. Całość liczy 120 stron maszynopisu i oparta jest na 151 pozycjach literaturowych.

W pierwszej części pracy Pani mgr Kosicka wyczerpująco opisała zagadnienia teoretyczne dotyczące akwaporyn, w której przedstawiła strukturę akwaporyn, ich klasyfikację oraz selektywność i odniosła się do badań literaturowych dotyczących akwaporyn mięczaków. Należy dodać, iż w tym zakresie wiedza jest bardzo uboga, bowiem dotyczy tylko 10 gatunków mięczaków spośród 130 tysięcy gatunków należących do typu Mollusca. Doktorantka podaje przykłady działania akwaporyn podczas stresu środowiska u różnych gatunków zwierząt oraz krótko opisuje stan estywacji jako reakcję zwierząt na stres wysokiej temperatury i suszy. Po wstępie teoretycznym Doktorantka jasno sformułowała cel pracy.

W dwóch kolejnych rozdziałach Materiały i Metody Doktorantka bardzo skrupulatnie opisuje wykorzystane odczynniki i zastosowane procedury. Według mnie w opisie ślimaka winniczka, od którego pobierano tkanki do badań (punkt 3.1.1, str. 24), zabrakło informacji, w jakich warunkach przetrzymywane były ślimaki, u których wywoływano estywację. Doktorantka podaje tylko, że ślimaki hodowano w szklanym terrarium, ale nie ma informacji o temperaturze i fotoperiodzie. Wiadomo, że oba te czynniki mogą mieć znaczenie dla wywoływania zmian, które towarzyszą estywacji (np. zmian aktywności enzymów antyoksydacyjnych). Zdaję sobie sprawę z tego, iż nie było to przedmiotem badań, niemniej jednak planując doświadczenia należałoby wyeliminować wszystkie czynniki, które w jakikolwiek sposób mogłoby wpływać na wynik badanego procesu. Nie można bowiem wykluczyć wpływu fotoperiodu na ekspresję genów badanych białek.

Za mocną stroną pracy należy uznać jej część metodyczną, która wymagała zastosowania wielu różnych metod i analiz, staranności i wysiłku, a także wielu powtórzeń. Pani mgr Kosicka posłużyła się szeregiem technik biologii komórki oraz genetyki. Dokładnie opisała następujące po sobie procedury: począwszy od izolacji narządów, poprzez izolację RNA, odwrotną transkrypcję, łańcuchową reakcję polimerazy, elektroforezę kwasów

nukleinowych, oczyszczanie DNA, a następnie powielanie produktów PCR metodą transformacji komórek bakteryjnych, klonowanie i transformację z wykorzystaniem wektorów, a skończywszy na izolacji plazmidów do transformacji komórek drożdży. Analiza funkcjonalna została wykonana w systemie eukariotycznym, z wykorzystaniem mutantu drożdży *Saccharomyces cerevisiae* pozbawionego genu *fps1*, kodującego akwagliceroporynę oraz mającego niefunkcjonalne akwaporyny ortodoksyjne.

Wszystkie otrzymane przez Doktorantkę wyniki zostały wnikliwie opisane. Zidentyfikowano sekwencje nukleotydowe kodujące akwaporyny ślimaka winniczka. Trzy spośród akwaporyn przewidywanych dla winniczka (HpAQP1, HpAQP2 oraz HpAQP6) zawierają dwa motywy NPA o najbardziej konserwatywnej sekwencji (asparagina-prolina-alanina). W pozostałych trzech (HpAQP3, HpAQP4, HpAQP5) w motywach NPA występują podstawienia. Co istotne, zidentyfikowano także aminokwasy budujące filtr selektywności. Poza tym podjęto próbę ustalenia ekspresji organo-specyficznej genów kodujących akwaporyny. W celu sprawdzenia zdolności drożdży *S. cerevisiae* do transportu wody oraz innych substancji przeprowadzono testy komplementacji, które wykazały, że białka HpAQP1, HpAQP2, HpAQP5 i HpAQP6 transportują wodę, białka HpAQP3 i HpAQP4 – glicerol, a ponadto białka HpAQP5 i HpAQP6 oprócz wody transportują H₂O₂. Wszystkie wyniki zebrane zostały w postaci tabel i rycin umieszczonych w tekście oraz załącznika na końcu monografii. Wyniki zostały również skonfrontowane w danymi literaturowymi, tam gdzie oczywiście było to możliwe.

Przedstawiona w pracy polemika została oparta na najnowszej literaturze naukowej. W pracy zacytowano imponującą liczbę publikacji (151 prac), z czego zdecydowana większość to publikacje opublikowane w ostatnich latach. W mojej ocenie wybór publikacji jest wyjątkowo trafny. W rozdziale Dyskusja Doktorantka pisze, iż jej badania są "właściwie pierwszym opracowaniem" akwaporyn u ślimaka lądowego. Ponieważ sama Autorka pisze o tym tak nieśmiało, chciałabym mocno podkreślić, iż Jej badania są pierwszym tego typu opracowaniem, co należy poczytać za Jej ogromny sukces.

Praca została napisana na ogół poprawnym językiem, z dobrze dobranymi odnośnikami. Wadą jest umieszczanie form graficznych (we Wstępie) w zbyt dużej odległości od miejsca, w których są one opisane (np. Ryc. 2 – opis na stronie 7, a rycina dopiero na stronie 9, Ryc. 4 – opis na stronie 11, a rycina dopiero na stronie 17, Tab. 1 – opis na stronie 13, a tabela na stronie 15). Podobnie, tabele i ryciny w rozdziale Wyniki, wspomniane w

tekście po raz pierwszy znajdują się na kolejnych stronach, często zbyt daleko od miejsca, w którym Autorka opisuje wyniki (na przykład Tab. 3 ze strony 48, o której mowa w opisie na stronie 46). Dość nietypowe jest także powtarzanie krótkiego fragmentu tekstu, na rozpoczęcie każdego kolejnego rozdziału, znajdującego się już we wstępie teoretycznym. Na pierwszy rzut oka taką prezentację metod czy wyników można by także uznać za wadliwą. Jednak te liczne powtórzenia wprowadzające w metodę lub uzasadniające jej wykorzystanie okazują się pomocne w pracy, w której wykorzystano tak obszerną liczbę procedur. Ostatecznie uważam, że choć nie jest to powszechnie stosowane w monografiach z zakresu nauk biologicznych, to znacznie ułatwia zrozumienie i uporządkowanie wiedzy oraz analizę wyników.

Praca nie jest pozbawiona błędów literowych, powtórzeń wyrazów czy błędów stylistycznych (jak na przykład, że białka „pełnią rolę”, powinno być „odgrywają rolę”, albo „pełnią funkcję”), a nawet bezsensownych zdań (np. Dyskusja strona 67, czwarte zdanie pierwszego akapitu, lub strona 70, przedostatnie zdanie drugiego akapitu). Stosowanie zbyt dużych skrótów myślowych może bowiem prowadzić do błędów merytorycznych. Błędna jest także numeracja poszczególnych podrozdziałów (klasyfikacja akwaporyn 1.4, we Wstępie) a nawet rozdziałów (Załącznik błędnie oznaczono jako rozdział 8, a według mnie jest to rozdział 10). Niektóre podpisy pod rycinami mogły być bardziej szczegółowe, np. – Rycina 12. Czytając podpis pod ryciną można się zastanawiać, czy analiza filogenetyczna przewidywanych akwaporyn winniczka dotyczy sekwencji aminokwasowych, czy nukleotydowych? W pracy wstępują także drobne niedociągnięcia merytoryczne. Na stronie 22 Doktorantka napisała, że „ślimaki spędzają zimę w uśpieniu”. Odrętwienie zimowe ślimaków winniczków jest zjawiskiem dobrze zbadanym i takie swobodne używanie eufemizmów w pracy naukowej jest niestosowne. Z pewnością nie wynika to z niewiedzy Doktorantki, tylko z użycia skrótu myślowego, czy nawet dosłownie wziętego tekstu z publikacji, którą cytowała (pochodzi ona jednak z 1983 roku). Ponadto napisała również (strona 64), że estywacja to proces ograniczenia aktywności, co błędnie można zinterpretować jako stan, w którym ślimaki wykazują aktywność tylko mniejszą niż zazwyczaj. A przecież estywacja to całkowite zaniechanie aktywności. Być może układ pracy jest niepełny, bo brakuje jasno sformułowanych wniosków, jednak można ich się doszukać na końcu dyskusji w akapicie Podsumowanie.

Wszystkie wymienione, z obowiązku recenzenta, uchybienia nie umniejszają wagi całej pracy, którą uważam za dobrze przygotowaną i bardzo wartościową merytorycznie.

Ocena merytoryczna

Oceniając dysertację należy zwrócić szczególną uwagę na rangę wybranego zagadnienia. Stres środowiska wymusza na organizmach żyjących w zmieniających się warunkach licznych przystosowań umożliwiających przeżycie stresu i wyjście z tego stanu bez większego uszczerbku. Dla mięczaków strefy umiarkowanej takim czynnikiem jest stres związany z odwodnieniem, i to zarówno w czasie lata, jak i zimą. Należy jednak pamiętać, że estywacja jest skutkiem odwodnienia, natomiast przed wejściem w stan odrętwienia zimowego ślimaki aktywnie tracą wodę z organizmu. Ze względu na elementarną funkcję wody, jej transport w organizmach żywych musi podlegać ścisłej kontroli. Białkami błonowymi tworzącymi kanały, które transportują wodę i niektóre metabolity poprzez błony biologiczne są akwaporyny.

Tematyka badawcza recenzowanej pracy wpisuje się w nurt pracy promotora i promotora pomocniczego, którzy ostatnio poszukiwali akwaporyn u mięczaków, a wcześniej zajmowali się tymi kanałami białkowymi u innych zwierząt. Swoje dotychczasowe osiągnięcia w badaniu akwaporyn opublikowali w renomowanych czasopismach. Mam tu na myśli dwie prace: pierwszą opublikowaną w *Journal of Membrane Biology* (2014), w której współautorem jest Pani mgr Kosicka oraz drugą opublikowaną w *European Journal of Cell Biology* (2016), w której Doktorantka jest pierwszym autorem. Druga z nich dotyczy akwaporyn u ślimaka winniczka, a zatem można powiedzieć, że pewien fragment badań już przeszedł przez pierwsze gęste sito pozytywnych ocen i recenzji specjalistów badanego tematu. Taka sytuacja ułatwia mi jako recenzentowi ocenę doktoratu, bowiem wcześniejsze recenzje i dopuszczenie tych wyników do druku są najlepszą oceną podjętego wysiłku.

Doktorantka zastanawia się także nad potencjalną rolą akwaporyn w dystrybucji innych niż woda związków i ich wykorzystaniem w procesie adaptacji do stresu odwodnienia. Biorąc pod uwagę zimowe odwodnienie chciałabym dodać, że stres zimna często związany jest także z syntezą i dystrybucją związków zwanych krioprotektantami, które chronią organizm przed całkowitym zamarznięciem. Za dystrybucję tych związków (np. glicerolu) odpowiadają także akwaporyny. Ustawiczna wymiana cząsteczek wody i innych związków zapewniających przeżycie w skrajnych warunkach termicznych pomiędzy komórkami a ich otoczeniem jest elementem niezbędnym prawidłowego funkcjonowania ślimaków lądowych.

Należy wspomnieć, że stanom odrętwienia, które są stanami hipometabolicznymi, towarzyszy stres oksydacyjny, którego negatywnym skutkiem przeciwdziałają antyoksydanty. Jednym z nich może być wspomniany w pracy mocznik. Za jego dystrybucję również mogą odpowiadać akwaporyny. Z powyższego wywodu wynika, iż rola akwaporyn w procesie adaptacji do niekorzystnych warunków środowiska jest nie do przecenienia.

Pani mgr Kosicka postawiła sobie za cel bardzo trudne zadanie polegające na identyfikacji sekwencji nukleotydowych kodujących akwaporyny u ślimaka winniczka oraz charakterystyce bioinformatycznej i funkcjonalnej białek przez nie kodowanych. Trzy główne zadania badawcze służące do zrealizowania postawionego celu obejmowały: 1) identyfikację sekwencji nukleotydowych kodujących akwaporyny ślimaka winniczka oraz analizę bioinformatyczną sekwencji aminokwasowych tych białek, 2) potwierdzenie funkcjonalności białek kodowanych przez zidentyfikowane sekwencje nukleotydowe za pomocą testu komplementacji w komórkach drożdży *S. cerevisiae* oraz 3) określenie zmian w poziomie ekspresji genów akwaporyn w trakcie zapadania winniczków w stan estywacji. Realizacja zamierzonego celu wymagała użycia wielu skomplikowanych, czasochłonnych i obarczonych ryzykiem błędów metod, które jednak zakończyło się sukcesem badawczym. Zadanie jakie postawiła przed sobą Doktorantka było bardzo ambitne, ale dzięki dobremu planowaniu badań, konsekwencji w działaniu i wykorzystaniu szerokiego wachlarza skomplikowanych technik badawczych ostateczny wynik jest satysfakcjonujący. Autorka podaje także strony internetowe, banki genowe i nazwy firm, z usług których korzystano dla osiągnięcia postawionych celów. Planowanie i spięcie tych wszystkich prac w jedną całość było niewątpliwie trudne i wymagało wysoko rozwiniętej umiejętności planowania pracy. Doktorantka doskonale posługuje się dostępnymi metodami biologii molekularnej od tradycyjnych (PCR) poprzez wykorzystanie jednej z najnowszych technik aktywności transkrypcyjnej, takich jak techniki sekwencjonowania nowej generacji (NGS).

Uważam, że Doktorantka w pełni rozwiązała oryginalny problem badawczy, jaki przed sobą postawiła. Było to możliwe dzięki dobrze przemyślanej, zaplanowanej pracy, która wykonywana precyzyjnie i konsekwentnie przyniosła spodziewane efekty. Udało się zidentyfikować i scharakteryzować rodzinę genów AQP u winniczka, a co więcej, ustalić ich funkcję. Identyfikacja i poznanie funkcji akwaporyn wybranego modelu wnosi wiele nowego nie tylko w biologię mięczaków, ale pozwala także zaprojektować dalsze badania, które mogą dotyczyć stresu zimna, krioprotekcji czy wielu innych, w których dochodzi do zmian w

poziomie uwodnienia. Oceniana praca łączy w sobie badania z pogranicza fizjologii, biologii komórki i genetyki prowadząc do rozwikłania problemu adaptacji i zmian na poziomie organizmu lub wyznaczania nowych nurtów badawczych, zarówno podstawowych, jak i porównawczych.

Najważniejsze osiągnięcia:

Rozprawa doktorska Pani mgr Ewy Kosickiej wnosi istotny wkład do poznania zagadnień zasygnalizowanych tytułem pracy. Za najważniejsze osiągnięcia Autorki uważam:

- scharakteryzowanie białek tworzących kanały wodne u lądowego ślimaka *Helix pomatia*,
- wykazanie, że białka HpAQP5 i HpAQP6 oprócz wody transportują także nadtlenek wodoru, a białka HpAQP3 i HpAQP4 oprócz wody transportują glicerol.

Ponadto analiza ekspresji genów *HpAQP* w trakcie zapadania w estywację pozwoliła na stwierdzenie, że stan ten jest procesem dynamicznym, w którym dochodzi do zmian dostosowujących organizm do niekorzystnych warunków środowiska, co oczywiście obala wciąż jeszcze (choć na szczęście coraz rzadziej) błędnie powtarzaną teorię, że zwierzęta zmiennocieplne biernie poddają się zmianom środowiska.

Otrzymane przez Doktorantkę wyniki uważam za bardzo wartościowe oraz inspirujące do prowadzenia dalszych badań. Jej osiągnięcia pozwalają oczekiwać dalszych postępów w tej dziedzinie, być może we współpracy z fizjologami. Na zakończenie pragnę jeszcze raz podkreślić złożoność problemu badawczego oraz ogromny nakład pracy konieczny do jego rozwiązania.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny dysertacja doktorska Pani mgr Ewy Kosickiej spełnia wymogi stawiane przed rozprawami doktorskimi określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2013 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017r poz. 1789, z późn. zm.) i zwracam się do Rady Wydziału Biologii UAM o dopuszczenie Pani mgr Ewy Kosickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Toruń, dnia 10 stycznia 2019r.

dr hab. Anna Nowakowska