

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 mózgowo, 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.