

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Klavdija JENKO

**OD STAROSTI ODVISNE SPREMEMBE DINAMIKE ODZIVA DIHALNE
VERIGE NA FIZIOLOŠKO OBREMENITEV OČESA MUHE (*Calliphora vicina*)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**AGE DEPENDENT CHANGES OF RESPIRATORY CHAIN RESPONSE
DYNAMICS INDUCED BY PHYSIOLOGICAL LOADS TO THE EYE OF A
BLOWFLY (*Calliphora vicina*)**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo v laboratoriju za fotorecepcijo na Katedri za fiziologijo živali Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Senat Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Gregorja Zupančiča in za recenzenta doc. dr. Petra Stuška.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Kazimir Drašlar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Gregor ZUPANČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Peter STUŠEK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 6. 7. 2007

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Klavdija Jenko

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	591.1:595.77(043.2)=863
KG	muha/ <i>Calliphora</i> / oko/ mitohondriji/ dihalna veriga/ citokromi/ staranje/ spektroskopija
AV	JENKO, Klavdija
SA	ZUPANČIČ, Gregor (mentor)/STUŠEK, Peter (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2007
IN	Od starosti odvisne spremembe dinamike odziva dihalne verige na fiziološko obremenitev očesa muhe (<i>Calliphora vicina</i>)
TD	diplomska naloga (univerzitetni študij)
OP	XI, 71 str., 1 pregl., 27 sl., 44 vir.
IJ	sl
JI	sl / en
AI	Z uporabo dinamične diferenčne refleksne spektroskopije smo preučevali dinamiko odziva mitohondrijske dihalne verige na fiziološko obremenitev (osvetlitev) v očesu belooke mutante muhe rdečeglave brenčičke (<i>Calliphora erythrocephala</i> - chalky). Prav tako smo z isto metodo spremljali od starosti odvisne spremembe v njenem delovanju. Analizirali smo časovne poteke spremembe koncentracije reducirane oblike nosilcev dihalne verige ob osvetlitvi in jih primerjali med sabo pri različno starih muhah. Nadalje smo primerjali tudi absorpcijske spektre oči različno starih muh. Ugotovili smo, da so časovni poteki oksidacije in redukcije posameznih dihalnih pigmentov ob fiziološki obremenitvi med seboj različni. Citokrom c in citokrom a se glede na začetno stanje reducirata, ostali nosilci pa se oksidirajo. Ob osvetlitvi pri časovnem poteku flavoproteinov, citokroma b in a ₃ pride do začetnega oksidacijskega tranzienta, pri citokromu c pa do značilnega prevoja. Praktično istočasen nastop tranzientov in zelo majhne spremembe redoks stanja ob aktivaciji oksidativne fosforilacije govorijo v prid teoretičnemu kinetičnemu modelu z imenom paralelni mehanizem aktivacije sistema oksidativne fosforilacije. Ugotovili smo, da se s staranjem muhe spreminjajo tako časovni poteki za posamezni nosilec kot tudi absorpcijski spektri mušjih oči. Vendar pa so bile te razlike največje v začetnem obdobju od izlega iz pupe in ne pri postaranih muhah. Pokazali smo, da so te razlike najverjetneje posledica naraščanja koncentracije elementov dihalne verige notranje mitohondrijske membrane mušjih fotoreceptorjev v začetnem obdobju po izlegu iz pupe, in da zraven igrajo vlogo tudi drugi procesi, kot so mogoče spremembe v strukturi fasetnega očesa ob dozorevanju ter morebiti celo spremembe v fototransdukcijskih regulacijskih mehanizmih in posledično sintezi proteinov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dn
 DC 591.1:595.77(043.2)=863
 CX fly/ *Calliphora*/ eye/ mitochondria/ respiratory chain/ cytochromes/ aging/ spectroscopy
 AU JENKO, Klavdija
 AA ZUPANČIČ, Gregor (supervisor)/STUŠEK, Peter (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Biology
 PY 2007
 TI Age dependent changes of respiratory chain response dynamics induced by physiological loads to the eye of a blowfly (*Calliphora vicina*)
 DT Graduation Thesis (University Studies)
 NO XI, 71 str., 1 pregl., 27 sl., 44 vir.
 LA sl
 AL sl / en
 AB With the usage of dynamic differential reflectance spectroscopy, we studied the response dynamics of mitochondrial respiratory chain to physiological loads (exposure to light) in the eye of white-eyed mutant fly *Calliphora erythrocephala* – chalky. We also studied, using the same method, the age-dependent changes in its function. We analysed the time courses of concentration changes of reduced form of carriers of the respiratory chain when exposed to light and compared the results obtained on flies of different age. Furthermore, we also compared the absorption spectra of eyes of variously old flies. We ascertained that the time courses of oxidation and reduction of individual respiratory pigments subjected to physiological load differ. The cytochrome c and a reduce with regard to the initial state whereas other carriers oxidise. When exposed to light, the time course of flavoproteins, cytochrome b and a₃ shows initial oxidation transient whereas in the time course of cytochrome c a typical kink occurs. Practically simultaneous appearance of transients and very small changes in redox states at the activation of oxidative phosphorylation speak in favour of a theoretical kinetic model so called “each step activation” or also “parallel activation” mechanism of the oxidative phosphorylation process. We concluded that the time courses of individual carriers as well as absorption spectra of fly eyes change with its age. Nevertheless, the major differences occurred in the initial stage after the hatching from the pupa rather than in aged flies. We have shown that the differences are most probably a consequence of increasing concentration of elements of respiratory chain of the inner mitochondrial membrane of fly’s photoreceptors in the initial stage after the hatching and that other processes also may play a significant role in this process. This other processes possibly include changes in the structure of the compound eye during maturation and even alterations in regulation mechanisms of the phototransduction cascade and consequently in the protein synthesis.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK.....	VII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD.....	1
1.1 Zgradba mušjega očesa.....	1
1.1.1 Vidni pigment.....	2
1.2 Fototransdukcija	3
1.3 Zgradba mitohondrija	5
1.4 Oksidativna fosforilacija.....	5
1.4.1 Kompleksi dihalne verige.....	7
1.4.2 Teoretične razlage mehanizma regulacije oksidativne fosforilacije.....	17
1.5 Povezava med fototransduksijskim procesom in aktivacijo dihalne verige v mitohondriju	20
1.6 Vpliv staranja organizma na funkcijo mitohondrijev	21
1.6.1 »Mitohondrijska teorija staranja«.....	22
1.6.2 Zgradba mitohondrijske DNA	23
1.6.3 Reaktivne kisikove in dušikove vrste ter antioksidantni zaščitni mehanizmi	24
1.6.4 Vpliv staranja na elemente dihalne verige.....	26
2 NAMEN DELA	28
Cilji naloge	28
Delovni hipotezi	28
3 MATERIALI IN METODE	29
3.1 Poskusne živali	29
3.2 Preparacija	29
3.3 Vlaženje zraka in spreminjanje plinske sestave v poskusni kamrici	30
3.4 Osvetljevanje	31
3.5 Beleženje odgovora	32
3.6 Poskusni protokol	33
3.7 Obdelava podatkov	34
4 REZULTATI	37
4.1 Značilnosti časovnih potekov sprememb oksidoredukcijskih stanj flavoproteinov in citokromov med osvetlitvijo.....	37
4.1.1 Numerično vrednotenje parametrov časovnih potekov	38
4.2 Časovni poteki odzivov dihalne verige na osvetlitev pri različno starih muhah	42
4.2.1 Primerjava časovnih potekov redoks stanj normiranih na maksimalno spremembo v N ₂ atmosferi	46
4.2.2 Numerično vrednotenje parametrov časovnih potekov posameznih elementov dihalne verige pri različni starosti muh.....	48
4.2.3 Časovni poteki sprememb koncentracij reduciranih oblik dihalnih pigmentov pri različno starih muhah	55

4.2.4	Analiza absorpcijskih spektrov fasetnega očesa različno starih muh.....	57
5	RAZPRAVA.....	60
5.1	Mehanizem aktivacije dihalne verige v mušjih fotoreceptorjih glede na časovne poteke sprememb redoks stanja nosilcev v dihalni verigi med osvetlitvijo.	60
5.2	Časovni poteki odzivov dihalne verige na osvetlitev ob staranju muh	63
6	POVZETEK	67
7	VIRI.....	69
	ZAHVALA.....	72
	PRILOGI.....	73

KAZALO SLIK

Slika 1: Sestavljeno nevrnalno superpozicijsko oko.	2
Slika 2: Shema dihalne verige..	7
Slika 3: Kompleks I sod.	9
Slika 4: Shema Q-cikla znotraj kompleksa III.	12
Slika 5: Shema funkcije citokrom c oksidaze.....	13
Slika 6: Shema možnega mehanizma črpanja protonov citokrom c oksidaze.....	14
Slika 7: Shematski prikaz ATP sintaze..	16
Slika 8: Trije možni mehanizmi regulacije oksidativne fosforilacije.	19
Slika 9: Predlagani mehanizem generacije prostih radikalov v mitohondrijih in zščita preko različnih antioksidantnih encimov.....	26
Slika 10: Shema sistema za črpanje vlažnega zraka v kamrico in shema sistema za vzpostavitev hipoksije.	31
Slika 11: Shema postavitve sistema za svetlobno draženje.	32
Slika 12: Povprečje časovnih potekov sprememb koncentracije reducirane oblike flavoproteinov in citokromov b, c, a, in a ₃ vseh 15 muh.....	37
Slika 13: Časovni poteki sprememb koncentracije reduciranih oblik posameznih elementov dihalne verige v času osvetlitve.....	39
Slika 14: Primerjava parametrov časovnih potekov sprememb koncentracije reduciranih oblik posameznih elementov dihalne verige v času osvetlitve.....	40
Slika 15: Primer časovnih potekov spremembe koncentracije reducirane oblike merjenih elementov dihalne verige pri eni 21 dni stari muhi ob 10 s osvetlitve v atmosferskih pogojih (graf a) in časovni poteki pri isti muhi ob vzpostavitvi N ₂ atmosfere (graf b).	42
Slika 16: Časovni poteki spremembe koncentracije reducirane oblike posameznih elementov dihalne verige ob osvetlitvi po tednih.....	44
Slika 17: Časovni poteki sprememb koncentracij reducirane oblike elementov dihalne verige normiranih na maksimum v N ₂ vseh 10 muh po tednih	47
Slika 18: a) Čas maksimuma tranzientov flavoproteinov po tednih, b) sprememba koncentracije reducirane oblike, ko je tranzient dosegel svoj maksimum, c) sprememba koncentracije reducirane oblike flavoproteinov po 10 s osvetlitve. ..	49
Slika 19: a) Čas maksimuma tranzientov citokroma b po tednih, b) sprememba koncentracije reducirane oblike nosilca, ko je tranzient dosegel svoj maksimum, c) sprememba koncentracije reducirane oblike citokroma b po 10 s osvetlitve....	50
Slika 20: a) Čas maksimuma prevoja citokroma c po tednih, b) vrednosti spremembe koncentracije reducirane oblike, ko je prevoj dosegel svoj maksimum po tednih, c) čas minimuma prevoja citokroma c po tednih, d) vrednosti spremembe koncentracije reducirane oblike pigmenta ob minimumu prevoja po tednih, e) vrednosti spremembe koncentracije reducirane oblike po 10 s osvetlitve.....	52
Slika 21: Koncentracija reducirane oblike citokroma a po 10 s osvetlitve, podan s standardnimi napakami. Vrednosti za posamezen parameter časovnega poteka, ki so med sabo značilno različne, so na grafu označene z zvezdico.	53
Slika 22: a) Čas maksimuma tranzienta citokroma a ₃ v posameznih tednih, b) sprememba koncentracije reducirane oblike, ko je tranzient dosegel svoj maksimum po tednih,	

c) sprememba koncentracija reducirane oblike citokroma a_3 po 10 s osvetlitve glede na starost muhe.....	54
Slika 23: Razlika med časovnimi poteki spremembe koncentracije reducirane oblike posameznih elementov dihalne verige v atmosferskih pogojih in v dušikovi atmosferi med osvetljevanjem pri različni starosti muhe.....	56
Slika 24: a) Absorpcijski spektri različno starih muh. b) sprememba absorpcije pri absorpcijskem vrhu pri $\lambda = 417 \text{ nm}$ in pri $\lambda \sim 600 \text{ nm}$ v odvisnosti od starosti muhe, c) absorpcijski spekter 14 dni starih muh, d) razmerje med a_{Me} in vrednostjo mediane pri različno starih muhah.	58
Slika 25: Rentgentska slika strukture superkompleksa $I_1III_2IV_1$	62
Slika 26: Splošna struktura signalne transdukcijske poti.	64
Slika 27: Kalcijevo- fosfolipidna in PKC pot signalne transdukcijske.....	65

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	absorbanca
A.E.	absorpcijska enota
acetil CoA	acetil koencim A
ATP, ADP	adenozintrifosfat, adenzindifosfat
Ca ²⁺	kalcijski kation
CaM	kalmodulin
cAMP	ciklični adenzinmonofosfat
cit a ₃	citokrom a ₃
cit a	citokrom a
cit b	citokrom b
cit c	citokrom c
CO ₂	ogljikov dioksid
DAG	diacilglicerol
e ⁻	elektron
ε	molarni ekstinkcijski koeficient
E ₀ '	standardni redoks potencial
ER	endoplazemski retikulum
FADH ₂ , FAD	flavin adenin dinukleotid, dihidroksi flavin adenin dinukleotid
FIR	angl.: »finite input response« - digitalni filter s končnim impulznim odgovorom
F	Faradejeva konstanta

Fe^{2+} , Fe^{3+}	železo, reducirana in oksidirana oblika
$\Delta\Psi_m$	membranski potencial notranje mitohondrijske membrane
FMN	flavin mononukleotid
FP	flavoprotein
G_{abg} , G_a	trimerni G-protein, alfa podenota G-proteina
GTP, GDP	gvanozintrifosfat, gvanozindifosfat
h ν	svetloba
H^+	proton
H^+ / Ca^{2+}	proton-kalcijev izmenjevalec
IP_3	inozitoltrifosfat
K^+	kalijev kation
$\Delta\mu_{\text{H}^+}$	protonski elektrokemijski gradient
Mg^{2+} , MgO	magnezijev kation, magnezijev oksid
Mn-, Cu-, Zn- SOD	manganova, bakrova in cinkova superoksidna dismutaza
mtDNA, nDNA	mitohondrijska DNA, jedrna DNA
mt NOS	mitohondrijska NO-sintaza
N_2	dušik
Na^+ / K^+ ATP-aza	natrij - kalijeva črpalka
Na^+	natrijev kation
NADH, NAD^+	nikotinamid adenin dinukleotid, reducirana in oksidirana oblika
NADPH, NADP^+	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, reducirana in oksidirana oblika
NO, NO $\cdot$, ONOO $^-$	dušikov oksid, dušikovoooksidni radikal, peroksinitrit
O_2	kisik

$O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $HO^{\cdot}$	superoksidni radikal, vodikov peroksid, hidroksilni radikal
Δp	protonska gonilna sila
PCA	angl: »principal component analysys« - analiza poglavitnih komponent
P, P_i	fosfat (anorganski fosfat)
PI, PIP, PIP_2	inozitol fosfat, fosfatidilinozitolfosfat, fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat
PKC	protein kinaza C
PLC- β	fosfolipaza C beta
PUFA	angl: »polyunsaturated fatty acids«
R	plinska konstanta
RACK	Ang: »receptors for activated C-kinases «-receptorji za aktivirane C-kinaze
RNS	angl: »reactive nitrogen species«- reaktivne dušikove vrste
ROS	angl: »reactive oxygen species«-reaktivne kisikove vrste
TRP, TRPL	angl.: »transient receptor potential, transient receptor potential like« - kationski kanal prehodnega receptorskega potenciala in kanal, podoben kanalu TRP
τ	časovna konstanta
UN	mitohondrijski kalcijev uniporter
UQ, UQH ₂ , UQH	ubikinon, ubikinol, semikinonski radikal
UV	ultravijolična svetloba

1 UVOD

1.1 Zgradba mušjega očesa

Žuželke imajo sestavljeno ali fasetno oko (Slika 1). Funkcionalna enota takega očesa je očesce ali omatidij. Število očesc na oko je odvisno od vrste in spola živali. Muhe iz rodu *Calliphora* imajo nevralno superpozicijsko oko. Aksoni retinalnih celic se zbirajo v ganglijski plasti in nato potujejo do optičnih lobusov (R1-R6) ali tvorijo sinapse v neuropili (R7 in R8).

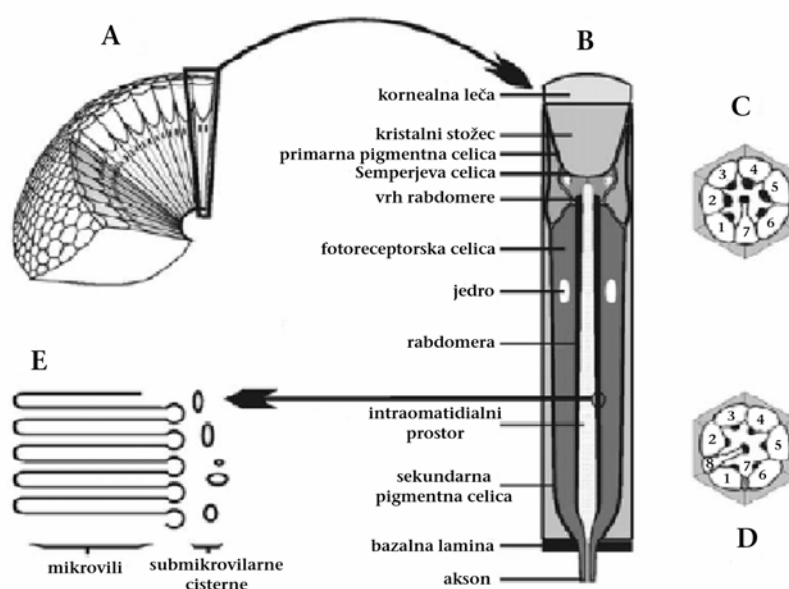
Fasetno oko rdečeglave brenčarke sestavlja približno 5000 omatidijev. V vsakem od njih se nahaja 20 celic, od tega 8 retinalnih. Premer posameznega omatidija je okoli 35 μm in je sestavljen iz dioptričnega in fotosenzitivnega aparata.

Dioptrični aparat rdečeglave brenčarke, s katerim se začenja pot svetlobe do fotoreceptorjev, sestavljata roženična leča in kristalni stožec, ki je ekstracelularni izloček štirih Semperjevih celic. Obe strukturi usmerjata svetlobo proti fotoreceptorskim celicam. Pot in količino svetlobe regulirajo primarne, sekundarne in terciarne pigmentne celice. Primarni pigmentni celici obdajata kristalni stožec. Njuna funkcija je absorpcija svetlobe v pigmentnih zrnih in s tem omejevanje količine svetlobe, ki vstopi v receptorske celice. Celotno očesce in odstavke do bazalne lamine obdaja šest sekundarnih in šest terciarnih pigmentnih celic, ki preprečujejo prehod svetlobe med očesci in jih s tem optično ločujejo.

Fotoreceptorski del očesca predstavlja osem retinalnih celic. Njihovi čutilni deli tvorijo odprt rabdom, kjer vsaka od čutilnih celic prispeva svojo rabdomero. Receptorske celice R1-R6 se razširjajo vzdolž celotne dolžine fotosenzitivnega aparata. Ker zaznavajo svetlobo monokromatsko, funkcionalno ustrezajo vretenčarskim palčkam. Celici R7 in R8 sta krajši in ležita ena nad drugo. Rabdomera R7 leži distalno in je bolj občutljiva na ultravijolično svetlobo, R8 pa proksimalno in je bolj občutljiva na modro oziroma zeleno svetlobo. Celice R7 in R8 imajo funkcionalno vlogo vretenčarskih čepkov, saj omogočajo barvno gledanje. Vsaka od receptorskih celic ima na površini, obrnjeni v notranjost

rabdoma, membrano sestavljeno iz približno 1.4×10^5 ($400/\text{mm}^2$) 1-2 mm dolgih in 60 nm širokih mikrovilov, ki skupaj gradijo rabdomero. Membrana mikrovilov vsebuje vidni pigment rodopsin. Centralni rabdomeri (R7 in R8) sta široki 1 mm, zunanje rabdomere (R1-R6) pa 2 mm. Na bazi mikrovilov se nahaja sistem submikrovilarnih cistern (SMC), ki je del gladkega endoplazmatskega retikuluma in predstavlja zalogo kalcija (Montell, 1999).

Kisik, ki ga receptorske celice potrebujejo, priteka po traheolah, ki izraščajo iz velikih zračnih vreč v glavi. Vsak omatidij oskrbuje po ena traheola. Razdalja med traheolo in katerokoli fotoreceptorsko celico ne presega 15 μm (Hamdorf s sod., 1988).



Slika 1: A) Sestavljeno nevralno superpozicijsko oko. B) Zgradba omatidija vinske mušice. C) Prečni pererez distalnega dela omatidija z R7. D) Prečni prerez proksimalnega dela omatidija z R8. E) Shema mikrovilarnih membrane (prirejeno po Paulsen in sod., 2001).

1.1.1 Vidni pigment

Glavni element fotoreceptorske celice predstavlja rabdomera z mikrovili. Mikrovilarna membrana vsebuje tesno zložene elemente transdukcijske kaskade, od katerih je 65% vidnega pigmenta rodopsina. V mikrovilu se nahaja preko 1000 molekul vidnega pigmenta (Stavenga, 1995). Fotoreceptorska celica z 1.4×10^5 mikrovili vsebuje 2×10^8 molekul rodopsina.

Molekula rodopsina je zgrajena iz dveh delov. Opsin predstavlja proteinski del molekule, sestavljen iz sedmih transmembranskih segmentov, z njim pa je preko schiffove baze kovalentno povezana neproteinska kromofora 3-hidroksi-retinal. Absorpcija fotona svetlobe ustrezne valovne dolžine povzroči konformacijsko spremembo rodopsina iz 11-cis v all-trans obliko in preko vmesnih kratkotrajnih termolabilnih stanj nastanek metarodopsina. Metarodopsin je termostabilen in se z absorpcijo dolgovalovne svetlobe ponovno izomerizira v rodopsinsko molekulo. Termostabilni stanji rodopsina in metarodopsina imata različni spektralni občutljivosti. Rodopsin celic R1-R6 ima absorpcijski vrh v modrozelenem delu spektra ($\lambda=490$ nm), metarodopsin pa v rdečem delu spektra ($\lambda=580$ nm). Izozbestična točka, pri kateri sta koncentraciji obeh oblik pigmenta enaki, je pri 510 nm (Stavenga, 1995).

1.2 Fototransdukcija

Fototransdukcija je proces, v katerem se svetlobna energija pretvori v električni odziv fotoreceptorja. Raziskave tega procesa so botrovale odkritju in karakterizaciji G-beljakovinske signalne verige, ki je splošno prisotna ne le v čutilnih temveč v praktično vseh celicah telesa (Hardie in Raghu, 2001). Ojačanje, ki je rezultat verige, omogoča fotoreceptorjem reakcijo že na posamezen foton svetlobe. Visoka hitrost delovanja verige, ki je posledica posebne strukturne organizacije elementov verige v mikrovilu, pa omogoča žuželkam časovno ločljivost preko 100Hz. Fototransdukcijo v očesu muhe sproži absorpcija fotona svetlobe ustrezne valovne dolžine, pri čemer se rodopsin konformacijsko spremeni v metarodopsin. Aktivni metarodopsin katalizira zamenjavo gvanozindifosfata (GDP), vezanega na α podenoto G-proteina, z gvanozintrifosfatom (GTP). $G\alpha$ podenota se odcepi od $\beta\gamma$ dimera in se veže na fosfolipazo C- β (PLC- β). PLC je encim, ki cepi fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat (PIP_2) na topni inozitoltrifosfat (IP_3) in membransko vezani diacilglicerol (DAG), ki ga DAG lipaza nato cepi v poli-nenasičene maščobne kisline (PUFA-polyunsaturated fatty acids).

Končni učinek z G-proteinom sklopljene signalne verige je aktivacija TRP in TRPL ionskih kanalčkov. Oba tipa kanalčkov spadata med kationske kanalčke, pri čemer TRP kanal 100-krat bolje prepušča Ca^{2+} kot Na^{+} ione, TRPL pa le 4-krat. Membrana mikrovila in posledično celotne receptorske celice se ob tem depolarizira, koncentracija kalcija v mikrovilih in citosolu pa se poveča. Vloga PIP_2 na aktivacijo TRPL kanalčkov je inhibitorna. Njegov razpad s pomočjo PLC pa povzroči, da se omenjeni kationski kanalčki aktivirajo. Po eni od hipotez bi bil za aktivacijo lahko odgovoren IP_3 , vendar pa recentni dokazi tej hipotezi nasprotujejo in predlagajo, da pride do aktivacije direktno ali indirektno preko DAG. Ta aktivira tudi za fotoreceptorje specifično protein kinazo C (PKC), ki negativno regulira TRP kanale. Kot posledica hidrolize DAG nastanejo večkrat nenasičene maščobne kisline (PUFA), ki tudi lahko neodvisno aktivirajo TRP in TRPL kanalčke (Chyb in sod. 1999).

Inaktivacija verige poteka s pomočjo arestina, ki prekine katalitsko aktivnost metarodopsina, medtem ko ga rdeča svetloba pretvori nazaj v rodopsin. Drugi encimi prisotni v mikrovilu pretvorijo preostale aktivne metabolite delovanja PLC- β preko serije reakcij nazaj v PIP_2 (Hardie, 2001).

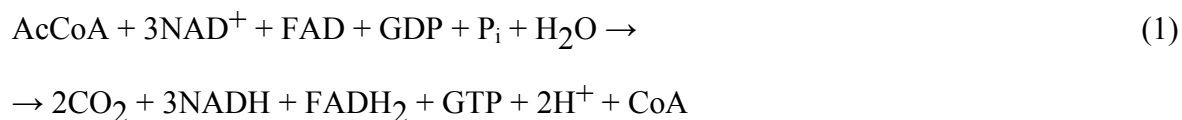
1.3 Zgradba mitohondrija

Mitohondrij je celični organel, sestavljen iz matriksa, ki ga obdajata notranja in zunanja membrana, med njima pa se nahaja intermembranski prostor. Notranja membrana je nagubana in tvori kriste (gube) različnih oblik. Ker so nanjo vezani encimi respiratorne verige, je gostota krist odvisna od respiratorne aktivnosti celic. Njena struktura je visoko specializirana in vsebuje velik delež fosfolipida kardiolipina, ki ima pomembno vlogo pri vzdrževanju neprepustnosti notranje membrane za ione. Poleg tega se v njej nahajajo tudi transportni proteini, ki omogočajo selektivno prepustnost za molekule, ki so potrebne za delovanje encimov matriksa oziroma predstavljajo njihov substrat. Najpomembnejše beljakovine, ki se v njej nahajajo, pa so štirje kompleksi respiratorne verige in ATP sintaza. Zunanjo membrano mitohondrija sestavlja veliko število transportnih proteinov porinov, zaradi katerih je ta propustna za vse molekule manjše od 5 kD vključno z manjšimi proteini. Na njej se nahajajo tudi encimi potrebni za sintezo lipidov in encimi, ki pretvorijo lipidne substrate v obliko, ki se nato metabolizira v matriksu.

1.4 Oksidativna fosforilacija

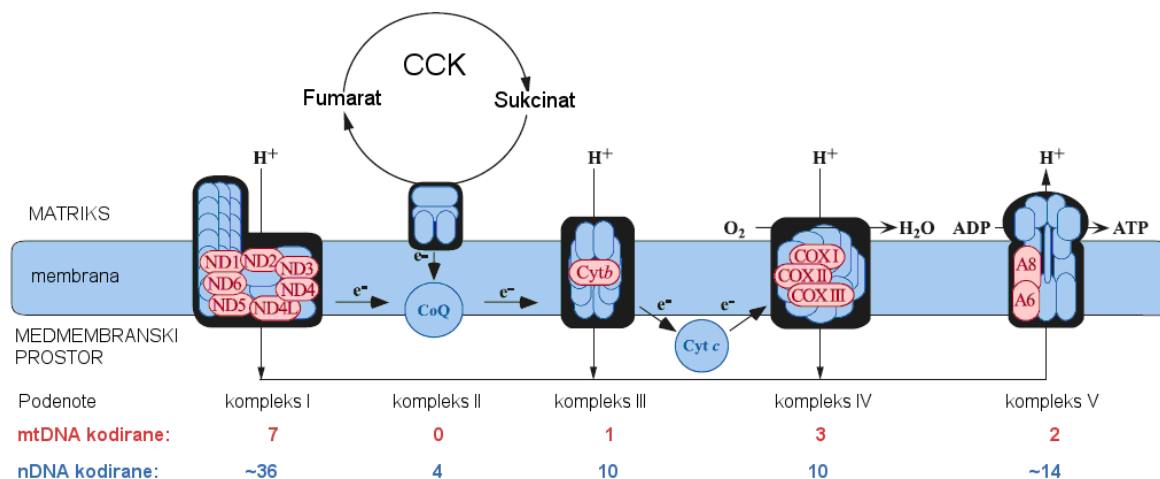
Oksidativna fosforilacija je dokončna oksidacija organskih snovi, pri čemer se sprošča energija. Kemično gledano gre za zaporedje oksidacij in redukcij. Sladkorji se najprej oksidirajo v procesu glikolize, ki poteka v citosolu celice. Produkt glikolize, piruvat, se transportira v matriks mitohondrija, kjer v procesu oksidativne dekarboksilacije tvori aktivirano očetno kislino, znano kot acetil koencim A (AcCoA). Tudi končni produkt oksidacije maščobnih kislin, ki se oksidirajo v procesu β -maščobne oksidacije v matriksu mitohondrija, je acetil koencim A. Ta vstopa v drugi sklop metabolnih procesov - Krebsov ali cikel citronske kisline. Cikel sestavlja serija oksido-redukcijskih reakcij, pri katerih se acetilna skupina oksidira v dve molekuli CO_2 . Bistvo Krebsovega cikla je prenos visoko-energijskih elektronov iz ogljikovih spojin na molekule NAD^+ in FAD, poleg tega pa je cikel tudi vir prekurzorjev za sintezo amino kislin, nukleotidnih baz, holesterola in porfirina.

Stehiometrija cikla je:



V procesu oksidativne fosforilacije se NADH in FADH₂ uporabita za redukcijo kisika. Reakcija poteče v seriji zaporednih redoks reakcij membranskih proteinov, ki tvorijo elektronsko transportno verigo. Elektroni iz NADH se na kisik prenašajo s pomočjo NADH-dehidrogenaze (iz FADH₂ pa s pomočjo sukcinat-dehidrogenaze), ubikinona, citokrom c reduktaze in citokrom c oksidaze. Energija, ki se sprošča med prehajanjem elektronov z enega prenašalca v dihalni verigi na drugega, se porabi za črpanje protonov v prostor med notranjo in zunanjo mitohondrijsko membrano. Vsak proton, ki se iz matriksa mitohondrija prenese v medmembranski prostor, prispeva h koncentracijski in električni razliki prek notranje mitohondrijske membrane - protonskemu elektrokemijskemu gradientu, ki ga ATP sintaza uporabi za tvorbo ATP.

1.4.1 Kompleksi dihalne verige



Slika 2: Shema dihalne verige. Podenote membranskih kompleksov, ki so kodirane z mitohondrijskim genomom so označene z rdečo barvo, oziroma z modro barvo, če jih kodira jedrni genom. S puščicami je označen prenos elektronov med kompleksi in končno na kisik ter črpanje protonov preko notranje mitohondrijske membrane, kar ima končno za posledica nastanek ATP (prirejeno po DiMauro, 2004).

Zaporedje prenašalcev elektronov na notranji membrani mitohondrija je bilo določeno na različne načine. V veliko pomoč je bila uporaba inhibitorjev, ki delujejo na različnih mestih dihalne verige. Z eksperimentalno določitvijo standardnih redoks potencialov (E'_0) je bilo ugotovljeno, da tok elektronov poteka spontano od prenašalcev z nizkim E'_0 na prenašalce z visokim E'_0 (tabela 1).

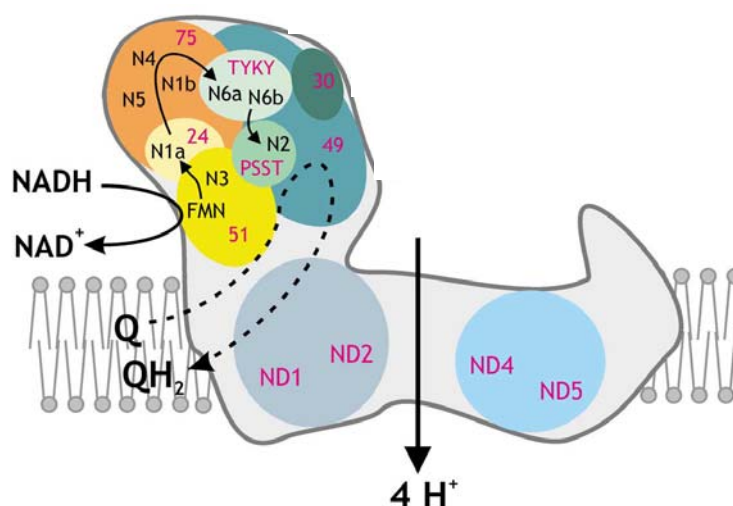
Tabela 1: Standardni redukcijski potenciali za respiratorno verigo.

Redoks reakcija	E' ₀ (V)
$2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$	-0.414
$\text{NAD}^+ + \text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NADH}$	-0.320
$\text{NADH dehidrogenaza (FMN)} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NADH dehidrogenaza (FMNH}_2\text{)}$	-0.30
$\text{Ubikinon} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{ubikinol}$	0.045
$\text{Citokrom b (Fe}^{3+}\text{)} + \text{e}^- \rightarrow \text{citokrom b (Fe}^{2+}\text{)}$	0.077
$\text{Citokrom c}_1 \text{ (Fe}^{3+}\text{)} + \text{e}^- \rightarrow \text{citokrom c}_1 \text{ (Fe}^{2+}\text{)}$	0.22
$\text{Citokrom c (Fe}^{3+}\text{)} + \text{e}^- \rightarrow \text{citokrom c (Fe}^{2+}\text{)}$	0.254
$\text{Citokrom a (Fe}^{3+}\text{)} + \text{e}^- \rightarrow \text{citokrom a (Fe}^{2+}\text{)}$	0.29
$\text{Citokrom a}_3 \text{ (Fe}^{3+}\text{)} + \text{e}^- \rightarrow \text{citokrom a}_3 \text{ (Fe}^{2+}\text{)}$	0.55
$\frac{1}{2}\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}$	0.816

1.4.1.1 Kompleks I (NADH dehidrogenaza)

Kompleks I je eden največjih in najbolj zapletenih znanih membranskih proteinskih kompleksov v živem svetu z molekularno maso okoli 1000 kDa. Kompleks I ima obliko črke L, katere daljši del predstavlja hidrofobni integralni membranski protein, krajši pa se izteza v matriks s hidrofilnim delom, ki vsebuje FMN in NADH aktivni center. Evkariontski kompleks I sestavlja več kot 35 podenot. 7 od 14 centralnih podenot je kodiranih v jedru in vključujejo vse znane redoks prostetične skupine, torej eno molekulo FMN (flavin adenin mononukleotid) in 8 do 9 železo-žveplovih centrov. Preostalih 7 ND centralnih podenot so hidrofobni proteini s številnimi domnevnimi membranskimi heliksi in so pri večini evkariontov kodirani z mitohondrijskim genomom. Zelo malo pa je znanega o funkciji preostalih akcesornih podenot. FMN predstavlja mesto vstopa elektronov iz NADH. Zaradi relativne stabilnosti semiflavina, FMN deluje kot elektronski pretvornik med elektronskim donorjem 2e^- in železo- žveplovimi centri, ki prenašajo po 1e^- na enkrat. Domnevajo, da je $\text{Fe}_4\text{-S}_4$ redoks center neposredni donor elektronov ubikinonu.

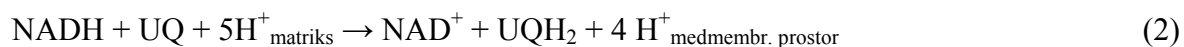
Kompleks I pa ima tudi funkcijo protonske črpalke. Ob prenosu $2 e^-$ iz NADH na konecim Q pride do črpanja 4 protonov v intermembranski prostor. Trenutno je najverjetnejši scenarij tega procesa ta, da sprememba redoks potenciala zaradi redukcije ubikinona okoli železo-žveplovega centra N2 povzroči specifične konformacijske spremembe. Te se nato prenesejo na hidrofobne podenote v membrani, ki izhajajo iz Na^+/H^+ ali K^+/H^+ antiporterjev in delujejo kot protonske črpalke. (Brandt s sod., 2003)



Slika 3: Približna pozicija centralnih podenot in Fe_2-S_2 centrov (N1a, N1b, N3, N4 in N5 redoks prostetične skupine) oz. Fe_4-S_4 centrov (N1c, N2 redoks prostetične skupine) znotraj kompleksa I, ki oblikuje črko L. Membranski del sestavlja 7 hidrofobnih podenot (ND1-ND6) in ND4L). Hipotetično zaporedje korakov elektronskega prenosa od NADH do ubikinona (Q) je označena s črnimi puščicami (prirejeno po Brandt s sod., 2003)

Na encim se veže NADH in prenese dva elektrona na FMN prostetično skupino kompleksa ter jo reducira v $FMNH_2$. Elektroni se nato prenesejo na Fe-S centre v encimu in na ubikinon ter ga reducirajo v ubikinol. Z redukcijo le-tega se preneseta dva protona iz matriksa.

Encim torej katalizira reakcijo:



Znanih pa je tudi že več kot 60 različnih družin snovi (naravnega in sintetičnega izvora), ki inhibirajo kompleks I. Večinoma so to hidrofobne ali amfipatične snovi, zato bi mnoge lahko delovale kot ubikinonski antagonisti. Kinetične študije združujejo inhibitorje kompleksa I v 3 razrede, pri čemer je predstavnik prvega piericidin A (razred I/A-tip), drugega rotenon (razred II/B-tip) in capsaicin (C-tip). Dejstvo, da so mitohondriji insektov še posebej občutljivi na inhibicijo kompleksa I, se s pridom uporablja tudi pri proizvodnji insekticidov.

1.4.1.2 Kompleks II ali sukcinat dehidrogenaza

Sukcinat dehidrogenaza je integralni protein notranje mitohondrijske membrane. Vsebuje dva tipa prostetičnih skupin in vsaj štiri različne proteine. Je encim cikla citronske kisline, ki katalizira nastanek FADH_2 z oksidacijo sukcinata v fumarat. FADH_2 ne zapusti kompleksa, zato se njegovi elektroni prenesejo na Fe-S centre in nato na ubikinson. V nasprotju s kompleksom I, kompleks II ne prenaša protonov, zato se z oksidacijo FADH_2 tvori manj molekul ATP kot pri oksidaciji NADH.

Ubikinson je benzokinon z dolgo izoprenoidno stransko verigo. Je majhna in hidrofobna molekula, ki lahko prosto difundira v lipidnem dvosloju notranje mitohondrijske membrane. Sprejme lahko en elektron, pri čemer nastane semikinonski radikal ($\text{UQH}\cdot$), ali dva elektrona, kjer nastane ubikinol (UQH_2). Ubikinson tako deluje kot povezovalac med dvo-elektronskimi donorji in eno-elektronskimi akceptorji. Ubikinol prenese elektrone od kompleksa I in II do kompleksa III.

1.4.1.3 Kompleks III ali citokrom c reduktaza

Evkariontska citokrom c reduktaza je homodimerni membranski kompleks, sestavljen iz več podenot. Vsako monomero sestavljajo tri katalitične podenote citokrom b, citokrom c_1 in Rieskejev protein, ki vsebujejo prostetične skupine. Citokrom b sestavljata dva hema tipa b (b_L in b_H), citokrom c_1 hem tipa c in Rieskejev protein z Fe_2-S_2 centrom. Poleg omenjenih podenot, se v vsaki monomeri nahaja še do 8 dodatnih podenot, katerih funkcija še ni jasna. Dve ločeni notranji elektronski transportni verigi povezujeta tri katalitična mesta za zunanje substrate. Na enem mestu citokrom c oksidira citokrom c_1 , preostali dve katalitični mesti pa se nahajata na citokromu b in sta vključeni v oksidacijo ali redukcijo ubikinona. Citokrom c reduktaza oksidira molekulo kinola in reducira vodotopen citokrom c in povezuje omenjeno redoks reakcijo s črpanjem protonov preko notranje mitohondrijske membrane. Produkt mehanizma Q cikla je prenos protona preko membrane. Pri tem gre za topografsko ločeni reakciji redukcije ubikinona in oksidacije kinola, ki se dogajata na nasprotni strani lipidnega dvosloja, posledica pa je prenos protona preko kinola čez membrano. Mesto, kjer se ubikinon reducira je označeno s črko N, ker se nahaja v bližini elektronegativne strani membrane (v nekateri literaturi je označeno tudi s Q_i), mesto oksidacije kinola pa s črko P, saj se nahaja v bližini elektropozitivne strani membrane (Q_0). Protoni vstopajo v cikel na mestu N, čez membrano jih prenese kinol, ki jih nato sprosti na mestu P. Zaradi ekstremne hidrofobnosti, se ubikinon in ubikinol nahajata samo znotraj hidrofobnega dela lipidnega dvosloja, česar prednost je to, da semikinonski intermediat ne more povzročiti tvorbe škodljivih kisikovih radikalov.

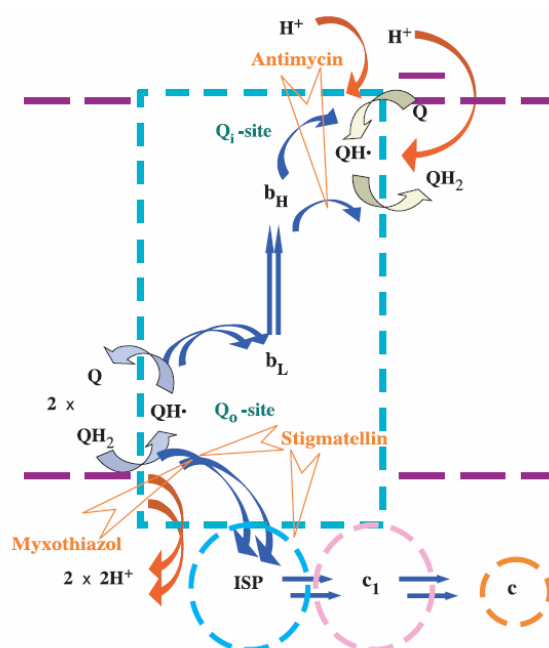
Eno zanimivejših odkritij je bilo to, da se katalitična domena Rieske-jevega proteina premika. Ti premiki naj bi bili pomembni za prenos elektronov iz QH_2 na mestu P na citokrom c_1 .

Mehanizem sklopitve transporta elektronov iz QH_2 na citokrom c in transmembranskega transporta protonov imenujemo Q-cikel. Cikel olajša tudi preklap iz dvo-elektronskega prenašalca ubikinola na eno-elektronski prenašalec citokrom c. Ubikinol se veže na mesto P in svoje elektrone odda posamično. En elektron se najprej veže na Rieskejev center, ta pa

ga prenese na citokrom c_1 in c , ki difundira od encima. Drugi elektron se prenese na citokrom b_L , citokrom b_H in na oksidirano kinonsko molekulo vezano na N mestu ter jo delno reducira. Tako se ubikinol na mestu P oksidira, njegovi protoni pa se sprostijo na citosolno stran membrane. Ubikinon nato difundira stran in naslednja molekula ubikinola zasede njegovo mesto. Adicija drugega elektrona na delno reducirano kinonsko molekulo na mestu N povzroči privzem dveh protonov iz matriksa in nastane ubikinol. Ti protoni tudi prispevajo

k protonskemu gradientu. Cikel se konča z oksidacijo dveh molekul ubikinola do ubikinona, redukcijo dveh molekul citokroma c , prenosom štirih protonov na citoplazemsko stran notranje mitohondrijske membrane in privzemom dveh protonov iz matriksa mitohondrija.

Celotna reakcija izgleda takole:



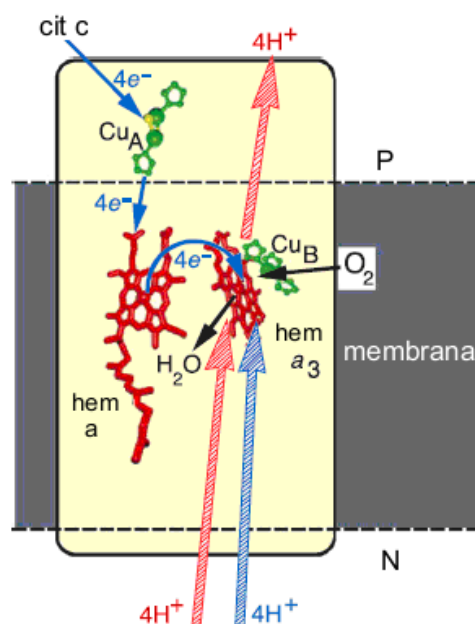
Slika 4: Shema Q-cikla znotraj kompleksa III. Z modrimi puščicami je prikazana pot elektronov, z rdečo pa pot protonov. Mesti Q_0 in Q_1 se nahajata na področju citokroma b (moder črtkan pravokotnik), kjer jih povezujeta hema b_L in b_H . Z oranžno puščico so prikazana mesta inhibicije za posamezen inhibitor (prirejeno po Crofts, 2004)

1.4.1.4 Kompleks IV ali citokrom c oksidaza

Citokrom c oksidaza se nahaja na koncu dihalne verige in katalizira redukcijo kisika, pri čemer nastane molekula vode ter omogoči prenos 4 protonov iz matriksa v medmembranski prostor:

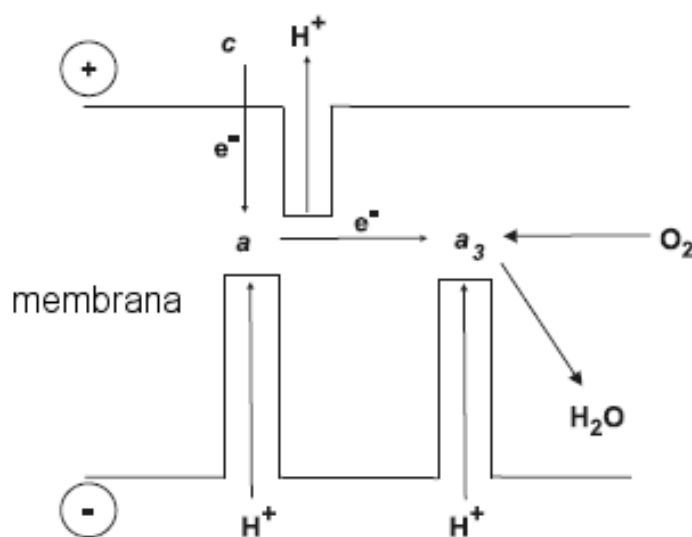


Kompleks sestavlja 13 podenot, pri čemer so 3 kodirane z mitohondrijskim genom. Sestavljata ga dva tipa hema a (a in a₃), ki se med seboj zaradi nahajanja v različnem okolju znotraj kompleksa razlikujeta, in trije bakrovi ioni, ki sestavljajo dvo jedrni center Cu_A/ Cu_A ter center Cu_B. Hem a se od hema v citokromih c in c₁ razlikuje v treh lastnostih: 1) formilna skupina zamenjuje metilno skupino, 2) ogljikovodikova veriga C15 zamenjuje vinilno skupino, 3) hem ni kovalentno vezan na protein.



Slika 5: Shema funkcije citokrom c oksidaze. Modre puščice označujejo kemično reakcijo redukcije kisika pri čemer nastane voda. Rdeče puščice označujejo črpanje protonov preko membrane (prirejeno po Wikström, 2004).

Kot kompleksa I in III tudi citokrom c oksidaza predstavlja protonsko črpalko, vendar pa se mesti vstopa elektronov in protonov v kompleks nahajata na nasprotnih straneh membrane. Donor elektronov kompleksa IV predstavlja citokrom c, ki je eno-elektronski prenašalec, in prinese elektron z P strani notranje membrane ter ga preko bakrovega centra Cu_A/Cu_A odda hemu a. S tem prenosom je povezan prevzem protona iz matriksa na še ne definiranem črpalnem mestu znotraj membranske domene kompleksa. Nadaljni prenos elektrona na binuklearno hem $\text{a}_3\text{-Cu}_B$ mesto je povezano s sprostitvijo protona v medmembranski prostor, čemur sledi prevzem novega protona iz matriksa na hem $\text{a}_3\text{-Cu}_B$ mestu, kjer pride do nastanka vode (Wikström, 2004).



Slika 6: Shema možnega mehanizma črpanja protonov citokrom c oksidaze (prirejeno po Wikström, 2004).

Tako naj bi prenos vsakega elektrona povzročil črpanje enega protona iz matriksa v medmembranski prostor, in vezavo protonov na molekulo kisika, adicija končnega, četrtega elektrona iz citokroma c na hem $\text{a}_3\text{-Cu}_B$ mesto pa bi pomenila odcep dveh molekul vode in oksidacijo encima.

Mehanizem prenosa protonov še vedno ni popolnoma pojasnjen, saj tu ni prisoten prenašalec protonov, kot na primer ubikinon v kompleksu III. Preko citokrom oksidaze c naj bi bil prenos protona mogoč zaradi nevtralnosti znotraj kompleksa, kjer adicija elektrona omogoči vezavo protona. Poleg tega lahko v $\text{a}_3\text{-Cu}_B$ centru prihaja do

konformacijskih sprememb, ki skrbijo, da se protoni črpajo le iz matriksa in se lahko sprostijo le v citosol.

1.4.1.5 Kompleks V ali ATP sintaza

Vsak proton, ki se iz matriksa mitohondrija prenese v medmembranski prostor, prispeva k protonskemu elektrokemijskemu gradientu ($\Delta\mu\text{H}^+$), ki ga izražamo v mV kot protonsko gonilno silo (Δp).

$$\Delta p \text{ (mV)} = \Delta\psi_m - (2.3RT/F) \Delta\text{pH}$$

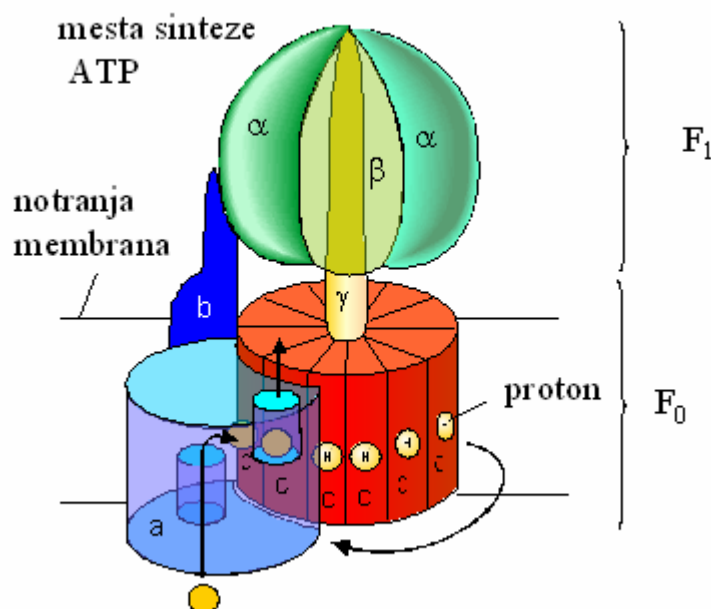
(pri 37°C, $\Delta p = \Delta\psi_m - 60\Delta\text{pH}$),

Kjer je $\Delta\psi_m$ mitohondrijski membranski potencial, ΔpH je pH gradient preko notranje membrane (pozitivna vrednost označuje kisli matriks), R, T in F pa se nanašajo na plinsko konstanto, absolutno temperaturo in Faradayevo konstanto. $\Delta\psi_m$ je komponenta, ki največ prispeva k Δp (Nicholls in Budd, 2000).

ATP sintaza je glavna pot za ponovni vstop protonov v matriks mitohondrija. Kolaps Δp ustavi sintezo ATP v mitohondriju in povzroči hitro hidrolizo citoplazmatskega ATP, saj ATP sintaza skuša obnoviti Δp in začne delovati v obratni smeri. ATP sintaza torej izkoristi protonski elektrokemijski gradient za endergoni proces ATP sinteze. Proces je termodinamično možen zato, ker elektronski prenos, ki generira protonsko gibalno silo vsebuje dovolj proste energije (okoli 34 kJ na mol elektronskih parov) za nastanek enega mola ATP, ki zahteva okoli 32 kJ.

Mitohondrijska ATP sintaza predstavlja ATPazo F-tipa in jo sestavljata 2 različni komponenti F_1 in F_0 . F_1 predstavlja periferni membranski protein F_0 pa je integralni protein. Katalitično domeno F_1 komponente predstavlja 5 globularno nameščenih proteinov α , β , γ , δ in ϵ v razmerju 3:3:1:1:1. Podenote γ , δ in ϵ tvorijo notranji povezovalni del, ki povezuje $(\alpha\beta)_3$ podkompleks F_1 z F_0 . Podkompleks $(\alpha\beta)_3$ pa se povezuje z F_0 preko

perifernega povezovalnega dela, ki ga sestavljata 1 a in 2 b podenoti komponente F_0 . Poleg omenjenih a in b podenot, komponento F_0 sestavlja še obroč iz verjetno 10 c podenot.



Slika 7: Shematski prikaz ATP sintaze. F_1 komponento sestavljajo α -, β -, in γ -podenote in verjetno tudi druge, odvisno od metode izolacije. F_0 komponento pa sestavljajo a-, b- in c-podenote (prirejeno po Stušek).

Za sintezo ATP so kritičnega pomena ustrezni premiki posameznih podenot, pri čemer osrednji povezovalni del rotira s frekvenco 50-100/s, ta pa je povezan s komponento F_0 , ki predstavlja izvor rotacije, to pa napaja tok protonov. Stopnja mitohondrijskega dihanja je odvisna od dostopnosti ADP za F_0 komponento ATP sintaze. Gradient ADP/ATP preko notranje mitohondrijske membrane ohranja v ravnovesju adenin nukleotidna translokaza, katere funkcija je zagotavljanje ADP v matriksu in ATP v citosolu, ki ga porabljajo od energije odvisni procesi. Eksperimentalno pridobljeno število protonov potrebnih za sintezo ene ATP molekule je ~3-4. Učinkovitost fosforilacije, določena na izoliranih mitohondrijih, je izražena kot razmerje ADP/O. Eksperimentalno ugotovljena vrednost učinkovitosti fosforilacije za oksidacijo ene NADH molekule je 2.6-2.7 in 1.6-1.7 za oksidacijo sukcinata. Te vrednosti so zelo blizu teoretičnim vrednostim ADP/O razmerja (2.5 in 1.5), ob predpostavki, da se na par elektronov iz NADH prečrpa 10 protonov čez notranjo mitohondrijsko membrano, iz sukcinata pa 6.

1.4.2 Teoretične razlage mehanizma regulacije oksidativne fosforilacije

Kot že omenjeno, je oksidativna fosforilacija v mitohondrijih glavni proces za produkcijo energije v obliki ATP. Hidroliza ATP pa je naprej gonilo za različne procese, kot so sinteza proteinov, DNA/RNA sinteza, ionski transport preko celičnih membran, glukoneogenezo, itd. Vendar pa se ob prehodu iz mirovnega stanja v aktivno stanje (na primer fotoreceptorja ob svetlobni stimulaciji) zahteve po energiji zelo povečajo.

To pomeni, da mora informacija za zagotovitev zadostne količine ATP glede na trenutno porabo, nekako priti do procesa oksidativne fosforilacije. Znano je že, da zunanje signale, ki stimulirajo metabolizem (in posledično stopnjo mitohondrijske respiracije), predstavljajo različni hormoni v nevzdražnih celicah in nevralna stimulacija v vzdražnih. Vendar pa še vedno ni pojasnjen mehanizem znotraj celične regulacije ATP produkcije in njegove porabe.

Glede na dosedanja dognanja in s pomočjo računalniških simulacij, naj bi porabo kisika in s tem oksidativno sintezo ATP v tkivih in celicah pri fizioloških pogojih, ki veljajo v intaktnem organizmu, povečal nek zunanji signal (S) kot na primer hormon, nevralna stimulacija ali v našem primeru svetloba. Ta signal se nato prenese preko nekega znotraj celičnega faktorja X, ki predstavlja zunanji efektor (ne intermediarni metabolit) za nekatere encime oz. dele bioenergetskega sistema celice. Mehanizmi regulacije oksidativne fosforilacije predlagani v literaturi pa so naslednji:

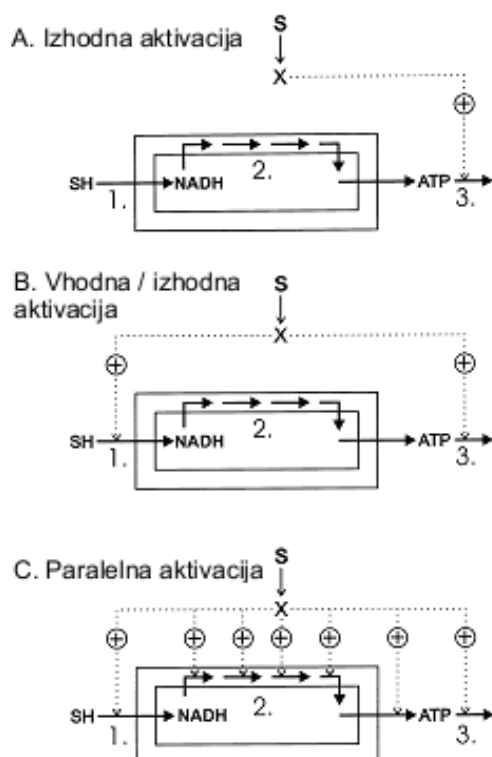
A) Izhodna aktivacija. X (vsaj v nekaterih primerih so to kalcijevi ioni) direktno aktivira samo ATP porabo (izhod sistema). Posebno mitohondrijske encime pa indirektno aktivirajo tudi spremembe v [ADP] in koncentracijah drugih metabolitov (npr. komplekse dihalne verige aktivira zmanjšanje Δp).

Primer tega tipa aktivacije predstavlja slika 8 A.

B) Vhodna/izhodna aktivacija. X (npr. Ca^{2+}) direktno aktivira ATP porabo (izhod) in dehidrogenacijo substrata (npr. preko piruvat dehidrogenaze, izocitrat dehidrogenaze,

α -ketoglutarat dehidrogenaze krebsovega cikla - vhod sistema), medtem ko mitohondrije posredno aktivira koncentracija ADP in/ali NADH. Ta tip mehanizma aktivacije je prav tako kot tudi prvi tip primer regulacije posredovane preko metabolitov (v povezavi z oksidativno fosforilacijo). Ta mehanizem je predstavljen na sliki 8 B.

C) Aktivacija na vsakem koraku oz. paralelna aktivacija (each-step activation). Zunanji efektor X aktivira neposredno tako porabo ATP in dehidrogenacijo substrata, kot tudi vse korake sistema oksidativne fosforilacije. V idealiziranem primeru, kjer bi bili vsi encimi do enake mere aktivirani, in posledično ne bi bilo sprememb v koncentraciji intermediarnih metabolitov, bi tak mehanizem aktivacije pomenil tipičen primer direktne regulacije. V realnih primerih pa posamezni koraki niso aktivirani v popolnoma enaki meri, zaradi česar pride do majhnih variacij v koncentraciji različnih metabolitov. Tako je mehanizem aktivacije na vsakem koraku kombinacija neposredne regulacije in regulacije posredovane z metaboliti. Prikazano na sliki 8 C.



Slika 8: Trije možni mehanizmi regulacije oksidativne fosforilacije. Posamezni koraki so ali aktivirani direktno preko zunanjega efektorja (prekinjene puščice) ali indirektno preko sprememb koncentracij metabolnih intermediatov. S- zunanji signal (hormon, nevralni signal); X-intracelularni efektor (zunanji glede na oksidativno fosforilacijo); SH-respiratorni substrat; 1., dehidrogenacija substrata; 2., posamezen korak oksidativne fosforilacije; 3., poraba ATP (prirejeno po Korzeniewski, 2001).

Mehanizem paralelne aktivacije najbolj ustreza celotnemu spektru obstoječih eksperimentalnih podatkov, pri čemer k povečanju pretoka preko sistema oksidativne fosforilacije prispevata tako neposredna kot posredna regulacija preko metabolitov ob povišanih zahtevah po energiji. Znotraj regulacije posredovane z metaboliti, glavni način prenosa stimulacije oksidativne fosforilacije predstavlja sprememba $[ADP]$, spremembe v $[ATP]$ in $[Pi]$ pa pri tem procesu igrajo le manjšo vlogo. Glavno kritiko omenjenemu mehanizmu pa predstavlja dejstvo, da fizična narava faktorja X, ki naj bi bil odgovoren za neposredno paralelno aktivacijo sistema oksidativne fosforilacije med prehodom iz manjše k večji obremenitvi, še ni jasna. Precej dokazov kaže na vpletenost Ca^{2+} ionov. Pomemben faktor pri tem naj bi bila vsaj v nekaterih celicah frekvenca kalcijevih oscilacij (bolj kot sama koncentracija omenjenih ionov, saj ta le v manjši meri aktivira izolirane

mitohondrije). To frekvenco naj bi nato po času integriral nek protein, analogen kalmodulinu, ki bi posledično aktiviral proteinsko fosforilacijo oz. defosforilacijo. Kar nekaj tarč paralelne aktivacije pa je že znanih. Ca^{2+} na primer aktivira dehidrogenaze Krebsovega cikla in glikogen fosfatazo. Vendar pa je čisto možno tudi, da je predlagani mehanizem aktivacije popolnoma neodvisen od kalcija. Tako je naravo faktorja oz. mehanizma, ki direktno aktivira vse komplekse dihalne verige še vedno treba odkriti na eksperimentalen način. Predstavljeni kinetični model tako predstavlja teoretično podlago za obstoj novega eksperimentalno še neodkrita fenomena.

1.5 Povezava med fototransduksijskim procesom in aktivacijo dihalne verige v mitohondriju

Signal, vpleten v mitohondrijsko aktivacijo, kljub intenzivnemu proučevanju ostaja slabo opredeljen. Zaradi aktivacije TRP in TRPL kanalčkov se poveča količina kalcija in natrija v citosolu, kar predstavlja metabolno breme za celico zaradi pospešenega delovanja $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ izmenjevalca in Na^+/K^+ ATP-aze. Slednje ni na bazi mikrovilov, ampak se nahaja na lateralni membrani fotoreceptorske celice (Baumann, 1997). Vsaj polovico energije, ki nastane z respiracijo mitohondrija, porabi Na^+/K^+ ATP-aza (Tsacopoulos, 1983). Zelo verjetno zato njeni razporeditvi sledijo tudi mitohondriji, saj se le-ti nahajajo prav tako na lateralni membrani in relativno daleč od mesta fototransduksijskega procesa oz. rabdomere.

Starejše poročilo Tsacopoulosa in sodelavcev (1983) kaže, da pride do povišanja porabe kisika pred aktivacijo največjega energijskega potrošnika - Na^+/K^+ črpalke, kar pomeni, da aktivacija mitohondrijev ni posledica dviga ADP, ki nastane ob njenem delovanju. Najbolj verjeten kandidat za aktivacijo mitohondrijev je dvig proste znotrajcelične koncentracije Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Ni pa še jasno po kakšnem mehanizmu se kalcijev signal razširja od mikrovila do mitohondrijev. Ena možnost je globalno povečanje kalcija v celici, kot posledica aktivacije TRP in TRPL kanalčkov, pri čemer naj bi kalcij difundiral od mikrovila do mitohondrijev. Po drugi hipotezi bi sproščanje kalcija lahko induciralo IP_3 preko IP_3R endoplazmatskega retikuluma, kalcijev signal pa bi se nato širil preko RyR na

endoplazmatskem retikulumu. Žuželčje fotoreceptorske celice imajo namreč poseben specializiran del gladkega ER, ki se imenuje sistem submikrovilarnih cistern (SMC) (Hardie 2001). Ta del ER je lahko razvit zelo dobro, na primer pri čebelah (Baumann, 2000), ali pa manj, v vsakem primeru pa je povezan s preostalim omrežjem ER v celicah, in se dotika tudi mitohondrijev. Povečanje znotrajcelične količine kalcija v fotoreceptorski celici po svetlobnem draženju nastane predvsem zaradi vstopa kalcija iz ekstracelularja preko kalcijevih kanalčkov v membrani mikrovilov. Poleg tega mutacija gena za IP_3R nima vpliva na potek fototransdukcije, kljub temu, da se v celici po svetlobnem draženju tvori relativno veliko IP_3 . Zaradi povečane koncentracije kalcija v celici začne mitohondrij akumulirati kalcijeve ione, kar pospeši delovanje dehidrogenaz v Krebsovem ciklu (piruvat dehidrogenaze, izocitrat dehidrogenaze, α -ketoglutarat dehidrogenaze) kot tudi ATP-sintaze, α -glicerofosfat dehidrogenaze in adenin nukleotid translokaze, depolarizira notranjo membrano organela in pospeši tok elektronov po kompleksih dihalne verige in s tem produkcijo ATP. V žuželčjih fotoreceptorjih se zdi aktivacija mitohondrijev s posredovanjem IP_3 smiselna predvsem v primerih, ko je depolarizacija šibka – torej, ko je jakost svetlobe nizka. Ob visoki jakosti svetlobe namreč pride dovolj Ca^{2+} v fotoreceptorsko celico skozi TRP in TRPL kanalčke (Oberwinkler in Stavenga, 1998; Oberwinkler in Stavenga, 2000).

1.6 Vpliv staranja organizma na funkcijo mitohondrijev

Glavni razlog za ogromno število študij na področju dogajanja v mitohondrijih v zvezi s staranjem je dejstvo, da so mnoge bolezni, ki nastopijo v povezavi s procesom staranja povezane z okvaro v delovanju mitohondrijev. Nekatere izmed teh bolezni so npr. alzheimerjeva bolezen, parkinsonova bolezen, huntingtonova bolezen, diabetes mellitus, itd.

Manifestacije z mitohondriji povezanih bolezni so zelo raznolike in vključujejo številne simptome ter prizadanejo različne organe. Vzrok zanje je večinoma sprememba v funkciji sistema oksidativne fosforilacije. Primeri kliničnih simptomov teh bolezni so različne nevrodegenerativne motnje, kot so slepota, izguba sluha, dementnost, motnje gibanja,

ataksija in encefalopatije. Mitohondrijski defekti so povezani tudi z mišično šibkostjo, srčno odpovedjo, renalno disfunkcijo in z boleznimi jeter. Ocenjujejo, da tovrstne bolezni prizadanejo vsaj 1 na 8500 ljudi.

1.6.1 »Mitohondrijska teorija staranja«

Staranje je kompleksen fiziološki fenomen o čigar izvoru je napisanih več teorij. Najpogosteje se pojavlja tako imenovana mitohondrijska teorija staranja, oz. z njo povezana teorija prostih radikalov, ki govori o tem, da je s časom akumulacija somatskih mutacij mitohondrijske DNA (mtDNA), ki nastanejo kot posledica škodljivega delovanja prostih radikalov, razlog za zmanjšanje funkcionalnosti mitohondrijev in s tem zmožnosti generacije ATP, glavnega vira dostopne energije v celici. Posledično se zmožnost delovanja celic, tkiv in celotnega organizma zmanjša in ima končno smrtne posledice.

Vendar pa so v nekaterih študijah na *Drosophili* ugotovili, da zmanjšanje produkcije reaktivnih kisikovih vrst – ROS (Reactive Oxygen Species) v mitohondrijih s pomočjo povečane ekspresije antioksidantov kot npr. superoksidne dismutaze in katalaze, ni potrdila te teorije. Nekateri rezultati so ji celo nasprotovali, saj je v nekaterih primerih povečana količina antioksidantov vodila v skrajšanje življenjske dobe mušic (Hui-Ying Lim s sod., 2006).

Mitohondrijski teoriji staranja nasprotujejo tudi nedavna dognanja, ki kažejo na to, da med procesom mitohondrijskega zlivanja prihaja do menjave mtDNA in njenih produktov. Ta proces imenovan mitohondrijska komplementacija, je za mitohondrije specifičen mehanizem, ki omogoča, da se patogena mutirana mtDNA ne izrazi. Po tej teoriji naj bi v sesalčjih celicah mitohondriji delovali kot ena sama celična enota. Naključne somatske mutacije komplementira zamenjava mtDNA in njenih produktov. To je zelo edinstven in učinkovit zaščitni sistem organelov z visokim oksidativnim potencialom, ki preprečuje ekspresijo respiratornih primankljajev na račun mutirane mtDNA. Dokazi kažejo na to, da je jedrni genom odgovoren za upad s starostjo povezane oksidativnofosforilacijske

kapacitete. Akumulacija različnih somatskih mutacij mtDNA v tkivih tako nima vzročne vloge ampak naj bi bila ena od oblik manifestacije procesa staranja. Tudi s pomočjo mikroskopije so pokazali, da mitohondriji v celici konstantno migrirajo. Med njimi prihaja do fuzije in fizije. Pri zlitju organelov so opazili tudi izmenjavo vsebine matriksa. Vendar pa aktivnost teh dveh procesov s starostjo upada (Sato s sod., 2006).

1.6.2 Zgradba mitohondrijske DNA

Mitohondriji so poliploidni organeli, saj vsak od njih vsebuje 5-10 kopij mtDNA, ki je krožna molekula v obliki dvojne vijačnice z zelo kompaktno organizacijo. Njena genska vsebina je v živalskem kraljestvu zelo konzervativna. Kodira 22 tRNA in 2 rRNA molekuli ter 13 polipeptidov, ki so vsi komponente sistema za oksidativno fosforilacijo. Ostale podenote omenjenega sistema in vsi proteini vključeni v vzdrževanje in ekspresijo mtDNA ter vse druge funkcije mitohondrijev so kodirane v jedrni DNA (Sánchez-Martínez s sod., 2006).

Posamezne celice vsebujejo več 1000 kopij mtDNA, ki naj bi bile v normalnih celicah identične (stanje imenovano homoplazmija). V nekaterih primerih, še posebej pri mitohondrijskih boleznih, pa v celici divji tip mtDNA in njena mutirana različica soobstajata v različnih razmerjih (heteroplazmija). Stopnja mutacij je pri mtDNA približno 10-krat večja kot pri jedrni DNA. Vendar pa to, glede na poliploidno naravo mitohondrijev in veliko število teh organelov v celici, še vedno predstavlja zelo majhen % celotne mtDNA v celici in nekateri avtorji menijo, da bi bil to lahko kvečjemu manjši faktor pri spremembah ATP zalog v senescentnih celicah in ne glavni. Večja stopnja mutacij mtDNA (delecij, točkovnih mutacij, duplikacij) v primerjavi z jedrnim genomom je posledica več dejstev. Prvo je to, da je mtDNA zelo občutljiva na škodo povzročeno z reaktivnimi kisikovimi vrstami zaradi visoko oksidativnih okoliščin v mitohondrijih. Ocenjujejo, da se 1-5% kisika, porabljenega pri procesu oksidativne fosforilacije preko elektronske transportne verige pretvori v ROS. Poleg tega mtDNA nima histonske zaščite, kot jo ima jedrni genom. Omeniti je potrebno tudi to, da mitohondriji nimajo signifikantnih popraviljalnih sistemov. Tako se v mtDNA nakopičijo različne somatske mutacije. Problem

pa se še ojača, če mutacija DNA nato sproži še večjo produkcijo ROS, ki povzroči še več mutacij.

1.6.3 Reaktivne kisikove in dušikove vrste ter antioksidantni zaščitni mehanizmi

Kot že omenjeno, je mitohondrij eno glavnih mest produkcije reaktivnih kisikovih vrst v celici. Njihov nastanek je posledica uhajanja elektronov iz elektronske transportne verige na mestih z visokim potencialom, kot sta kompleks I in Q cikel znotraj kompleksa III. Preko redukcije kisika z enim elektronom nastane relativno stabilen intermediat $O_2^{\cdot-}$. Večina $O_2^{\cdot-}$ (70-80%) je sproščenega v matriks, le 20-30% pa v medmembranski prostor. Za nastanek $O_2^{\cdot-}$ sta bili opisani 2 glavni reakciji. Prva je avto-oksidacija intermedjata semikinona ($UQH^{\cdot} + O_2 \rightarrow UQ + H^+ + O_2^{\cdot-}$) in druga preko reakcije kisika s FMN $^{\cdot}$ (FMNH₂/FMN koencima) NADH dehidrogenaze ($FMNH + O_2 \rightarrow FMN + H^+ + O_2^{\cdot-}$). Fe-S center N1a kompleksa I pa naj bi preprečeval generacijo superoksidnega aniona. $O_2^{\cdot-}$ je prekursor večine ostalih ROS in mediator oksidativnih verižnih reakcij. Dismutacija $O_2^{\cdot-}$, ki poteka spontano ali preko reakcije katalizirane s superoksidno dismutazo (SOD), povzroči nastanek H_2O_2 . Nastanek H_2O_2 je reguliran z metabolnim stanjem mitohondrija in z intramitohondrijsko koncentracijo NO, ki je celični fiziološki regulator mitohondrijske respiracije. Sintetizira ga mtNOS (mitohondrijska NO - sintaza) ali pa pride v mitohondrij preko NO - donorjev. Aktivnost mtNOS se v procesu staranja zmanjša. V mitohondriju NO inhibira respiracijo preko hitre, selektivne in reverzibilne inhibicije kompleksa IV preko kompeticije s O_2 . NO inhibira tudi elektronski prenos v kompleksu III in poveča nastanek $O_2^{\cdot-}$ in H_2O_2 . Ta reakcija je pogosto prisotna v molekularnih mehanizmih nevroloških bolezni. Aktivnost mtNOS je regulirana preko membranskega potenciala, ki nadalje regulira privzem O_2 in nastanek H_2O_2 . Spremenjeno signaliziranje preko NO in H_2O_2 , ki oddifundirata v citosol, predstavlja zelo verjetno razlago za zmanjšanje biogeneze mitohondrijev ob staranju, kar doprinese k pomanjkanju celične energije, apoptozi in fiziološkemu propadanju tkiva ob staranju.

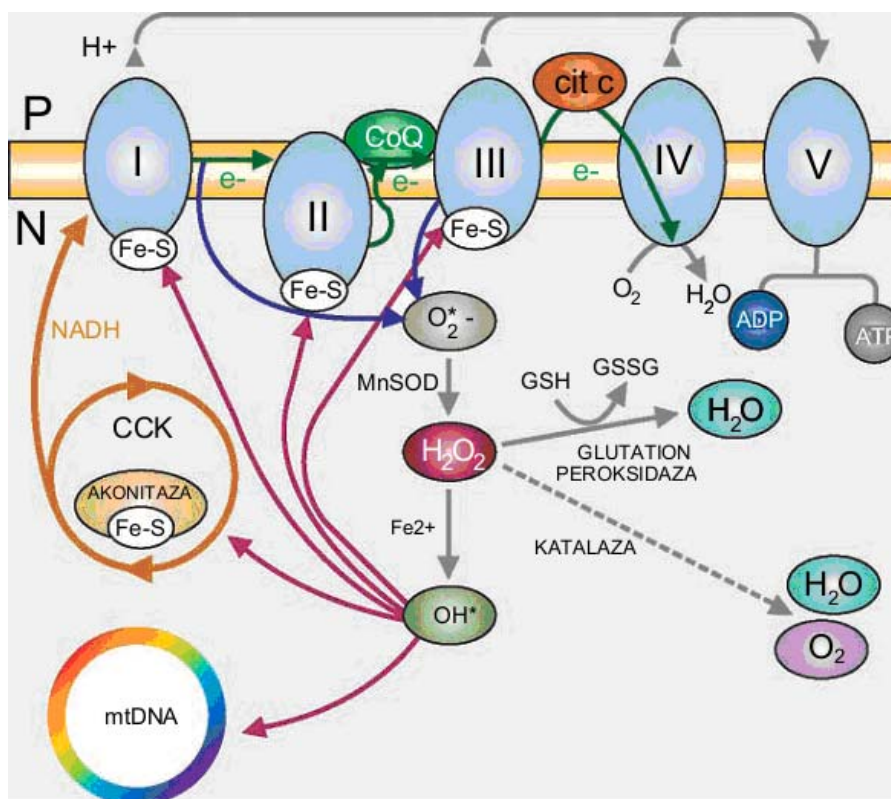
Produkcija H_2O_2 v metabolnem stanju, kjer je respiratoren substrat prisoten, ADP pa ne (kontrolna ali mirovna respiracija), je 4-5 krat večja kot v stanju, ko sta prisotna tako

respiratorni substrat kot tudi ADP (stanje aktivne respiracije). Na stopnjo produkcije vodikovega peroksida močno vpliva tudi gibanje ionov preko notranje mitohondrijske membrane, kar nakazuje na regulacijo avto-oksidacije UQH preko membranskega potenciala. Vodikov peroksid se nato lahko popolnoma reducira v vodo ali pa ob prisotnosti kovinskih ionov preko fentonove reakcije le delno v $\text{OH}\cdot$. Hidroksilni radikal je eden najmočnejših oksidantov v naravi.

Superoksidni anion lahko reagira tudi z drugimi radikali vključno z $\text{NO}\cdot$ v reakciji, ki jo kontrolira hitrost difuzije obeh radikalov. Njun produkt peroksinitrit je ravno tako zelo močan oksidant. Peroksinitrit je prisoten v fizioloških pogojih v zelo majhni koncentraciji. Če pa se ta poveča, ONOO^- ireverzibilno inhibira kompleksa I in III, kar vodi v poslabšanje funkcije mitohondrijev in v apoptozo.

Oksidante, ki izvirajo iz $\text{NO}\cdot$, so poimenovali reaktivne dušikove vrste – RNS (Reactive Nitrogen Species; Turrens, 2003). ROS in RNS pod normalnimi fiziološkimi pogoji in znotraj nekega koncentracijskega območja konstantno nastajajo in so pomembni regulatorji mnogih celičnih funkcij, delujejo pa tudi kot sekundarni sporočevalci, ki aktivirajo določene transkripcijske faktorje. Prevelika produkcija prostih radikalov pa je za celico škodljiva. Vzrok za prekomeren nastanek ROS so lahko različni defekti pri kompleksih dihalne verige ali druge mitohondrijske motnje. Te v končni fazi lahko povzročijo celično smrt in inducirajo apoptozo tako, da zvečajo prepustnost membrane in sprostitev apoptotskih faktorjev, kot je citokrom c (Yau-Huei Wei in Hsin - Chen Lee, 2002). Za take mitohondrije je tako poleg zmanjšanega transporta elektronov in prevzema kisika značilna tudi povečana vsebina oksidacijskih produktov fosfolipidov, proteinov in DNA, zmanjšan membranski potencial ter povečana velikost in krhkost teh organelov.

Proti temu so zato aerobni organizmi razvili različne antioksidantne zaščitne mehanizme, ki vključujejo superoksidne dismutaze (v matriksu mitohondrijev se nahaja Mn-SOD, v intermembranskem prostoru pa Cu in Zn-SOD), ki pretvori $\text{O}_2^{\cdot-}$ v H_2O_2 , tega pa nato glutathion peroksidaza ali katalaza pretvorita v vodo. V mitohondrijskih membranah se nahaja tudi antioksidant tokoferol (vitamin E). Vendar pa se aktivnost in koncentracija teh antioksidantnih encimov s staranjem spreminja (večinoma upada).



Slika 9: Predlagani mehanizem generacije prostih radikalov v mitohondrijih in zščita preko različnih antioksidantnih encimov. Uhajanje prostih elektronov (modre puščice) povzroči nastanek superoksidnega aniona, tega pa nato SOD pretvori v vodikov peroksid, ki pa ga pretvorita v vodo in kisik glutation peroksidaza in katalaza (prirejeno po Linford, 2006).

1.6.4 Vpliv staranja na elemente dihalne verige

Pri študijah na staranih tkivih sesalcev (glodalcev) so ugotovili, da se količina mitohondrijev s staranjem ne zmanjša, pač pa je razlog v zmanjšani stopnji elektronskega prenosa zaradi zmanjšane aktivnosti kompleksa I in IV notranje mitohondrijske membrane. Kompleksa I in IV ob staranju kažeta selektivno zmanjšanje encimske aktivnosti v mitohondrijih izoliranih iz podganjih in mišjih jeter, možganov, srca in ledvic, medtem ko na kompleksa II in III proces staranja nima večjega učinka. Zakaj pride do zmanjšane aktivnosti kompleksov I in IV še ni pojasnjeno. Predlagane so naslednje razlage: encimska inhibicija preko inhibitorjev, nastalih v procesu staranja, od starosti odvisne modifikacije

encimov in zmanjšana ekspresija proteinov. Tako so mtNOS, kompleks I in kompleks IV notranje mitohondrijske membrane glavni pokazatelji staranja tkiva.

Tudi nekateri rezultati histokemijskih in histokemijsko - imunskih študij kažejo na to, da s starostjo prihaja do strukturnih in funkcijskih defektov kompleksov dihalne verige in do upada sposobnosti sinteze ATP.

Na nepropustnost notranje membrane za H^+ in na aktivnost F_1 -ATP sintaze pa naj bi staranje vplivalo le v zelo majhni meri, saj zaenkrat še ni direktnih dokazov, ki bi potrdile domneve, da se s starostjo poveča permeabilnost notranje membrane za protone.

Proces staranja negativno vpliva tudi na aktivnost adenin nukleotid translokaze, ki katalizira hitro izmenjavo ADP/ATP med citosolom in mitohondriji (Navarro in Boveris, 2007).

2 NAMEN DELA

Cilji naloge

Z uporabo dinamične diferenčne refleksne spektroskopije smo želeli preučiti dinamiko odziva dihalne verige na fiziološko obremenitev očesa muhe (*Calliphora vicina*) in spremembe le-te v povezavi s starostjo poskusnega objekta. V prvem delu poskusov je bil naš namen ugotoviti sam časovni potek in amplitudo sprememb redoks stanj nosilcev v času obremenitve (osvetlitve). V drugem delu pa smo se osredotočili na to, kakšne so spremembe teh časovnih potekov v odvisnosti od starosti muhe, v katerem obdobju so te spremembe največje in posledično (poskušati) sklepati na to, kaj se dogaja z aktivnostjo mitohondrijev in koncentracijo dihalnih pigmentov v fotoreceptorjih pri procesu staranja.

Delovni hipotezi

1. Iz časovnih potekov sprememb redoks stanj dihalnih pigmentov ob obremenitvi (osvetlitvi) lahko sklepamo na način in tip aktivacije mitohondrijev v mušjih fotoreceptorjih
2. S staranjem se spreminjata tako mirovno redoks stanje dihalnih pigmentov kot tudi oblika in amplituda sprememb ob obremenitvi.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Poskusne živali

Preparacijo in izvajanje poskusov smo povzeli po Lah (2002). Naše poskusne živali so bile muhe *Calliphora vicina* – chalky (rdečeglava brenčacka). Chalky je oznaka za belooke mutante, brez fenotipsko izraženega zaščitnega pigmenta v očeh. Odrasle muhe smo gojili na gojišču s saharozo in vodo, pri 22 °C in 12 urnem dnevno-nočnem ciklu. Da bi zagotovili zadostno količino vitamina A, potrebnega za razvoj muh z normalno vrednostjo ksantopsina v fotoreceptorjih, smo ličinke gojili na gojišču z jetri.

Pri poskusih smo uporabljali samo samce. V prvem delu poskusov so bile živali stare od 6 do 17 dni. Pri ugotavljanju sprememb dihalne verige v povezavi s starostjo muh pa smo merili v razmaku enega tedna od njihovega izlega do smrti vseh preostalih osebkov. Prve meritve smo izvedli na dan izlega ter 7., 14., 21. in 28. dan po izlegu.

3.2 Preparacija

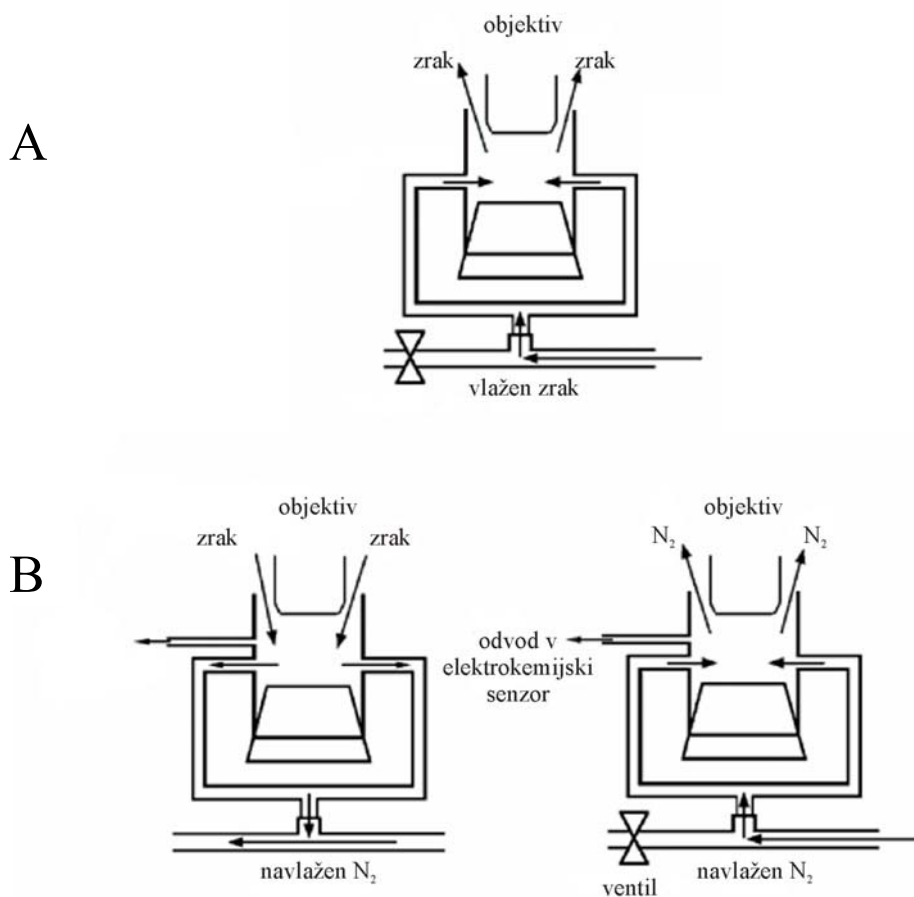
Preparacijo smo opravili s pomočjo stereo mikroskopa s stransko osvetlitvijo z rdečo svetlobo, ki ni aktivirala rodopsina in smo tako zmanjšali neželeno draženje očesa. Poskusnim živalim smo najprej s pinceto odstranili noge. Zatem smo jih pritrdili na poseben kovinski jarem pritrjen na ležaj, ki je omogočil gibljivost jarma in s tem optimalnejšo postavitev za čimboljši svetlobni izplen. Jarem je ločil glavo od oprsja in zadka živali ter jim tako že delno omejil premikanje. Za dokončno imobilizacijo muh smo uporabili zmes dveh delov kolofonije in enega dela voska (Krönigova mešanica), s katero smo na jarem pritrdili oprsje, krila, glavo in ustni aparat (lizalo). Pri tem smo pazili, da so odprtine trahej ostale proste. Abdomen smo pustili prost. Jarem z muho smo vstavili v prvem delu poskusov v plutovinast podstavek, v drugem delu pa v podstavek iz polimerizirane epoksidne smole (SPURR). Na podstavek smo nataknilo plastično kamrico z nastavki za cevke za dovod plina. Nameščanje preparata na merilni mikroskop je prav tako

potekalo pri rdeči svetlobi, ki ni aktivirala rodopsina in smo tako zmanjšali neželeno draženje očesa pred poskusom.

3.3 Vlaženje zraka in spreminjanje plinske sestave v poskusni kamrici

Kamrico s podstavkom in muho smo namestili pod objektiv mikroskopa in nanjo namestili tri cevke, dve za dovajanje vlažnega atmosferskega zraka oz. za dovajanje vlažnega dušika in eno za odvod plinske mešanice v elektrokemijski senzor P_{O_2} (ECHO, Slovenija). Z vlaženjem kamrice s preparatom smo preprečili izsušitev očesa in posledično spremembo absorpcijskih spektrov zaradi sprememb optične poti v očesu. Pri poskusih v atmosferskem zraku in v dušiku smo za vlaženje plina uporabljali dva ločena sistema. Med serijo poskusov v atmosferskih pogojih smo uporabljali vlažilnik zraka domače izdelave (sestavljen iz steklenice za vodo in difuzorja) preko katerega smo s pomočjo membranske akvaristične črpalke (Trixie, Nemčija) vpihavali zrak na preparat. Pri meritvah v dušiku pa smo zato, da bi ohranili kar največjo nasičenost dušika z vodno paro, le-tega navlažili v ločeni vlažilni posodi (Schott, Nemčija) in ga vpihavali v kamrico ob pomoči membranske črpalke (ECHO, Slovenija).

Pravilno delovanje sistema za dovajanje dušika smo nadzirali z elektrokemijskim senzorjem za P_{O_2} (ECHO, Slovenija). Dušik smo dovajali preko mešalnega merilca pretoka (Cole-Parmer, ZDA), ki je bil povezan z jeklenko z dušikom. Anoksijo smo vzpostavili s pomočjo tro-smerne solenoidnega ventila (Jakša, Slovenija), ki je deloval kot prekinjevalec pretoka. Celoten sistem je deloval po principu Venturijeve cevi. Črpalka, ki je sesala zrak mimo kamrice, je v povezavi z nadtlakom na strani mešalnega ventila ustvarjala tlačno razliko, ki je omogočala zadostno hitrost toka dušika mimo kamrice. Ob tem je prišlo do Bernoullijevega efekta in s tem sesanja zraka iz poskusne kamrice. Ob zaprtju solenoidnega ventila je zaradi hitrega povečanja tlaka plin vdrl po obeh cevkah v kamrico. Pretok dušika med poskusom je bil približno 2290 ml/min, oziroma 38 ml/s. Ventil smo s krmilili s pomočjo programa, ki je bil napisan v programu Matlab (Math Works, ZDA), preko serijskega izhoda na računalniku in tranzistorskega stikala.

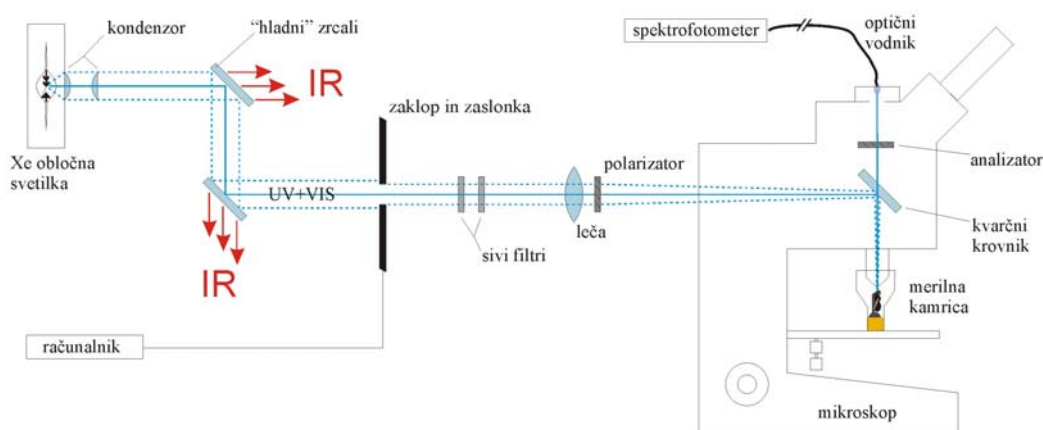


Slika 10: A) Shema sistema za črpanje vlažnega zraka v kamrico, B) shema sistema za vzpostavitev hipoksije.

3.4 Osvetljevanje

Oko smo med poskusom osvetljevali z belo svetlobo. Kot vir svetlobe smo uporabili ksenonsko obločno žarnico (Osram) z močjo 900W. Svetloba je šla najprej skozi dvojni periskopski filter, ki prepušča IR, odbija pa kratkovalovno svetlobo, tako da je nadaljnja svetloba vsebovala valovne dolžine med 300 in 700 nm. S tem smo preprečili neposredno segrevanje preparata med poskusom.

Za periskopskim filtrom smo postavili zaklop z zaslonko (Compur, Nemčija), ki je zagotavljal nadzorovano trajanje svetlobnega dražljaja. Za njim smo namestili 2 siva filtra (Carl Zeiss, Nemčija) s skupno prepustnostjo 0.06. Za filtri smo v času nameščanja preparata namestili še rdeči filter. Sledila je leča z goriščno razdaljo 1 m, ki je skupaj z objektivom zbirala svetlobo v ravnini preparata. Svetloba je bila nato usmerjena v refleksi mikroskop (Leitz-Orthoplan, Nemčija). Uporabili smo objektiv Zeiss Neofluar z 10-kratno povečavo in numerično aperturo 0.25 (Zeiss, Nemčija). Z vertikalnim premikanjem mikroskopske mizice smo svetlobo zbrali na mušjem očesu. Objektiv ni imel kvarčne optike in je zato prepuščal le svetlobo valovnih dolžin večjih od 360 nm.



Slika 11: Shema postavitve sistema za svetlobno draženje. IR – infrardeča svetloba, VIS – vidna svetloba, UV – ultravijolična svetloba.

3.5 Beleženje odgovora

Zato, da smo lahko optimizirali dinamično območje merilnega signala in ga uskladili z dinamičnim območjem spektrofotometra, smo se morali znebiti svetlobnih odbojev s površine očesa in leč v objektivu. To smo storili s pomočjo kombinacije dveh polarizacijskih filtrov - polarizatorja na strani vpadne in analizatorja na strani odbite svetlobe. Z optičnim vodnikom smo mikroskop povezali s spektrofotometrom z uklonsko mrežico (Ocean Optics, USB2000, ZDA) katerega območje občutljivosti je 200 do 800

nm, spektralna ločljivost pa 0.3 nm. Vse meritve smo delali s 50 ms časom integracije, ki je predstavljal optimalni kompromis med občutljivostjo, dinamičnim obsegom, razmerjem signal/šum in časovno ločljivostjo. Za izračun vrednosti refleksije in absorpcije smo posneli tudi referenčne spektre za temo in svetlobo. Referenčni spekter za svetlobo smo določili z odbojem svetlobe od kosa MgO, ki ima skoraj raven odbojni spekter v željenem območju.

3.6 Poskusni protokol

Praktični del naloge je bil izveden v dveh serijah poskusov, in sicer je imela vsaka serija malo drugačen protokol.

V preliminarinih poskusih je bil naš protokol v enem kosu in precej dolg (25x180s), pri čemer smo se srečali z dvema težavama, in sicer s spreminjanjem intenzitete svetlobe, ki jo je oddajala ksenonska obločna svetilka in s časovno oz. temperaturno odvisnimi premiki emisijskih vrhov njenega spektra. Zato smo uvedli večurno ogrevanje in stabilizacijo svetilke pred poskusi ter razbitje enega dolgega protokola na tri krajše, med katerimi smo vsakič ponovno posneli referenčne spektre (odboj z MgO).

Osvetljevanje smo prav tako kot dušikovo atmosfero krmilili s pomočjo programske sekvence napisane v programu Matlab. V prvi seriji poskusov je bil protokol tako sestavljen iz treh ponovitev, od katerih je vsaka trajala 10x120s. Interval osvetlitve muhe pa je trajala 10s, medtem ko je interval teme med osvetlitvami trajal 110s. Le-ta je bil potreben za povrnitev stopnje oksidativnega metabolizma v stanje pred draženjem (Pangršič, 2001; Meglič 2004). Po vsaki ponovitvi protokola desetih osvetljevanj smo izmerili še referenčni spekter (odboj z MgO).

Druga serija poskusov je bila enaka prvi, le da smo po zaključku treh serij osvetljevanja uporabili še protokol anoksije, ki je bil opisan že poprej (Lah 2002; Zupančič 2003; Čehovin 2004) – 20s amosferski zrak, 120s N₂ in 120s atmosferski zrak.

3.7 Obdelava podatkov

Spektre, smo obdelali v programu Matlab (Math Works, ZDA). Osnovni algoritem je bil opisan poprej (Zupančič, 2003). Vendar pa je obstajalo nekaj razlik v začetnih fazah priprave in analize podatkov, v katerih se postopek razlikuje od že opisanega.

Našo surovo časovno-spektralno matriko je sestavljalo 800x6000 spektrov. Tro-dimenzionalni graf, ki ga je taka matrika opisala, je po spektralni osi sestavljalo ~ 800 vrednosti med 350 in 690 nm. Po časovni osi pa smo med 10 s osvetljevanja dobili 200 spektrov (naš integracijski čas je bil 50 ms); torej 2000 spektrov v eni ponovitvi oziroma 6000 v treh.

Take surove spektre smo nato uporabili za izračun reflektance, absorpcije in diferenčnih absorpcijskih spektrov. Spektralno reflektanco ($R_{(s)}$) smo izračunali kot razmerje med spektralno refleksijo poskusnega objekta ($I_{izm(s)}$) ter spektralno refleksijo standarda ($I_{MgO(s)}$), pri čemer smo od obeh poprej odšteli spektralni signal izmerjen v temi ($I_{tema(s)}$):

$$R_{(s)} = \frac{I_{izm(s)} - I_{tema(s)}}{I_{MgO(s)} - I_{tema(s)}} \quad (5)$$

Nato smo izračunali spektralno absorpcijo ($A_{(s)}$) kot negativni logaritem spektralne reflektance:

$$A_{(s)} = -\log_{10} R_{(s)} \quad (6)$$

Ter diferenčne absorpcijske spektre, pri čemer je n-ti diferenčni absorpcijski spekter ($\Delta A_{n(s)}$) predstavljal razliko v absorpciji med n-tim (katerimkoli izmerjenim) spektrom v posamezni ponovitvi ($A_{n(s)}$) in referenčnim absorpcijskim spektrom ($A_{ref(s)}$):

$$\Delta A_{n(s)} = A_{n(s)} - A_{ref(s)} \quad (7)$$

Za referenčni spekter smo v prvem delu poskusov vzeli povprečje med 1. in 10. spektrom, torej prvih 500 ms osvetlitve, pri protokolu v dušiku pa med 40. in 80. spektrom, v obeh primerih pri atmosferskih pogojih. Na ta način smo dobili časovno-spektralno matriko diferenčnih spektrov. Taki spektri so predstavljali zelo majhne spremembe – le pribl. 0,1% prvotnega signala in so bili zaradi slabega razmerja signal/šum zelo šumni. Signal je šumen iz več razlogov. Glede na izvor so to termični šum CCD senzorja, šum zaradi ojačanja,

šum zaradi digitalizacije (spektrofotometer OceanOptics USB2000 ima le 12-bitni A/D pretvornik t.j. 4096 nivojev digitalizacije) ter nenazadnje šum zaradi nihanja jakosti svetlobe Xe obločne svetilke. Tipično razmerje signal/šum je pri spektrofotometru USB2000 1:200. Vendar pa se da s pomočjo postopkov, kot so digitalno filtriranje, povprečevanje in predvsem uporaba metode analize poglavitnih komponent (PCA), razmerje signal/šum močno izboljšati do te mere, da je končno razmerje precej boljše kot 1:50000. Toda metoda PCA, oz. metoda povprečevanja kot dejansko posebna oblika PCA, deluje tem bolje čim več sorodnih spektrov je v časovno-spektralni matriki. Zato je bil glavni razlog za izbor našega protokola takega kot je bil v tem, da smo dobili zelo veliko število spektrov, kar je bil prvi korak k izboljšanju razmerja signal/šum.

Za zmanjšanje šuma smo spektre najprej filtrirali s FIR (angl. "finite impulse response") digitalnim filtrom 5-ega reda, ki je efektivno spektralno ločljivost zmanjšal na 3nm. V prvi fazi smo diferenčne spektre filtrirali z dvo-dimenzionalnim Gausovim filtrom (Matlab, Math Works, Image Processing Toolbox). Filtriranju je sledila razredčitev točk po spektralni osi v razmerju 1:5, kar je izločilo večino informacije izven 3nm ločljivosti in zmanjšalo velikost spektralno-časovne matrike. V drugi fazi smo za zmanjšanje šuma uporabili metodo analize poglavitnih komponent (podroben opis v Zupančič 2003; angl. Principal component analysis ali PCA) oz. razčlenbo posamičnih vrednosti signala (angl. Singular value decomposition ali SVD). S PCA smo število informacij, dobljenih iz časovnega sosledja spektrov, zmanjšali na le 7 najbolj pomembnih spektralnih in 7 najbolj pomembnih časovnih komponent, ki opišejo >99.8 % celotne variance – t.i. reducirana časovno-spektralna matrika. PCA nam je poleg teh komponent dal še dodaten rezidualni vektor časovnega poteka, ki je vezan na nespecifične optične spremembe. Te nastanejo zaradi premikanja živali med poskusom ali drugih sprememb optične poti, kot je npr. nabrekanje mitohondrijev. Iz teh poglavitnih komponent smo nato zopet rekonstruirali časovno-spektralno matriko, brez naključnih sprememb, ki so nastale kot posledica šuma.

V zadnjem koraku obdelave podatkov smo dobljeno reducirano časovno-spektralno matriko uporabili za izračun prispevkov spektralnih komponent, ki smo jih dobili iz literature (Zupančič, 2003; Čehovin 2004).

Pri tem smo uporabili Lambert-Beerov zakon, ki se glasi:

$$A = \varepsilon cl \quad (8)$$

Pri čemer je A absorpcija, ε molarni absorpcijski količnik, c koncentracija in l dolžina optične poti. Seveda smo za vse elemente uporabili diferenčne spektralne vrednosti:

$$\Delta A_{n(s)} = \varepsilon_{\text{diff}(s)} cl \quad (9)$$

Pri čemer smo molarne ekstinkcijske količnike za diferenčne spektre ($\varepsilon_{\text{diff}(s)}$) za posamezne dihalne pigmente pridobili iz literature (Zupančič, 2003). Natančne dolžine poti svetlobe v omatidiju nismo poznali. Ta je namreč zaradi večkratnih odbojev najverjetneje daljša, kot je dvakratna dolžina omatidija, predvsem pa ne gre za eno samo pač pa za statistično distribucijo mnogih optičnih poti. Zato smo spremembo koncentracijo reducirane oblike nosilcev glede na začetno stanje izrazili kar kot produkt spremembe koncentracije in dolžine optične poti (Δcl) z enoto [μMcm]:

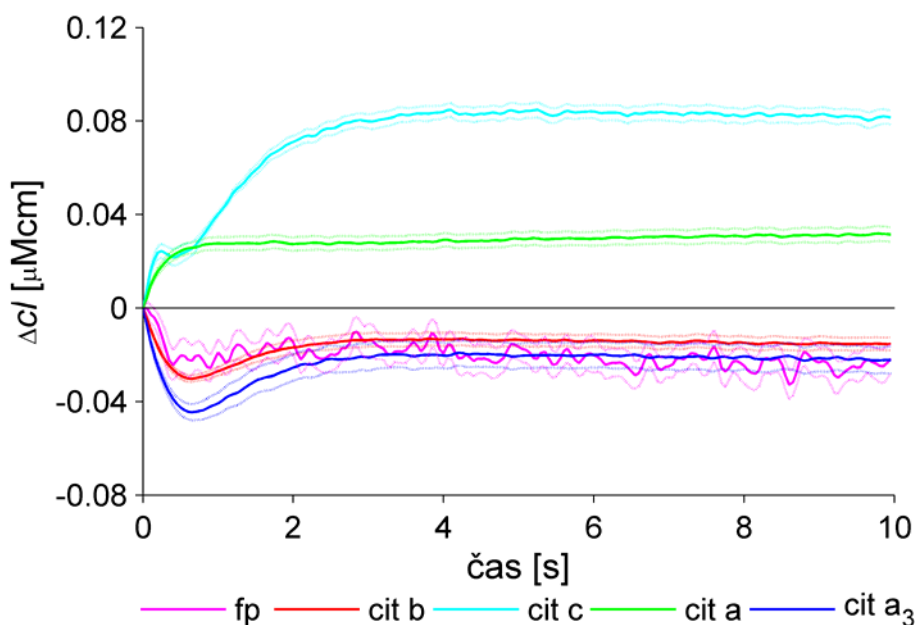
$$cl = \frac{\Delta A_{n(s)}}{\varepsilon_{\text{diff}(s)}} \quad (10)$$

4 REZULTATI

4.1 Značilnosti časovnih potekov sprememb oksidoredukcijskih stanj flavoproteinov in citokromov med osvetlitvijo.

V tem delu poskusov smo uporabili 15 muh, starih od 6 do 17 dni. Na grafih so ob vrednostih meritev podane standardne napake, če ni označeno drugače.

Ob osvetlitvi mušjega očesa pride do spremembe absorpcijskih spektrov vseh dihalnih pigmentov – flavoproteinov ter citokromov b, c, a in a_3 , kar je posledica spremembe njihovega redoks potenciala. Spremembe smo izračunali tako, da pozitivna sprememba pomeni povečanje stopnje redukcije. Tako nam časovni poteki dejansko prikažejo, kolikšna je v določenem času sprememba koncentracije (Δc) reducirane oblike posameznega pigmenta. Sama sprememba koncentracije pa je še pomnožena z dolžino optične poti (l), ki je v poskusih, zaradi razlogov navedenih v poglavju materiali in metode, nismo določali.



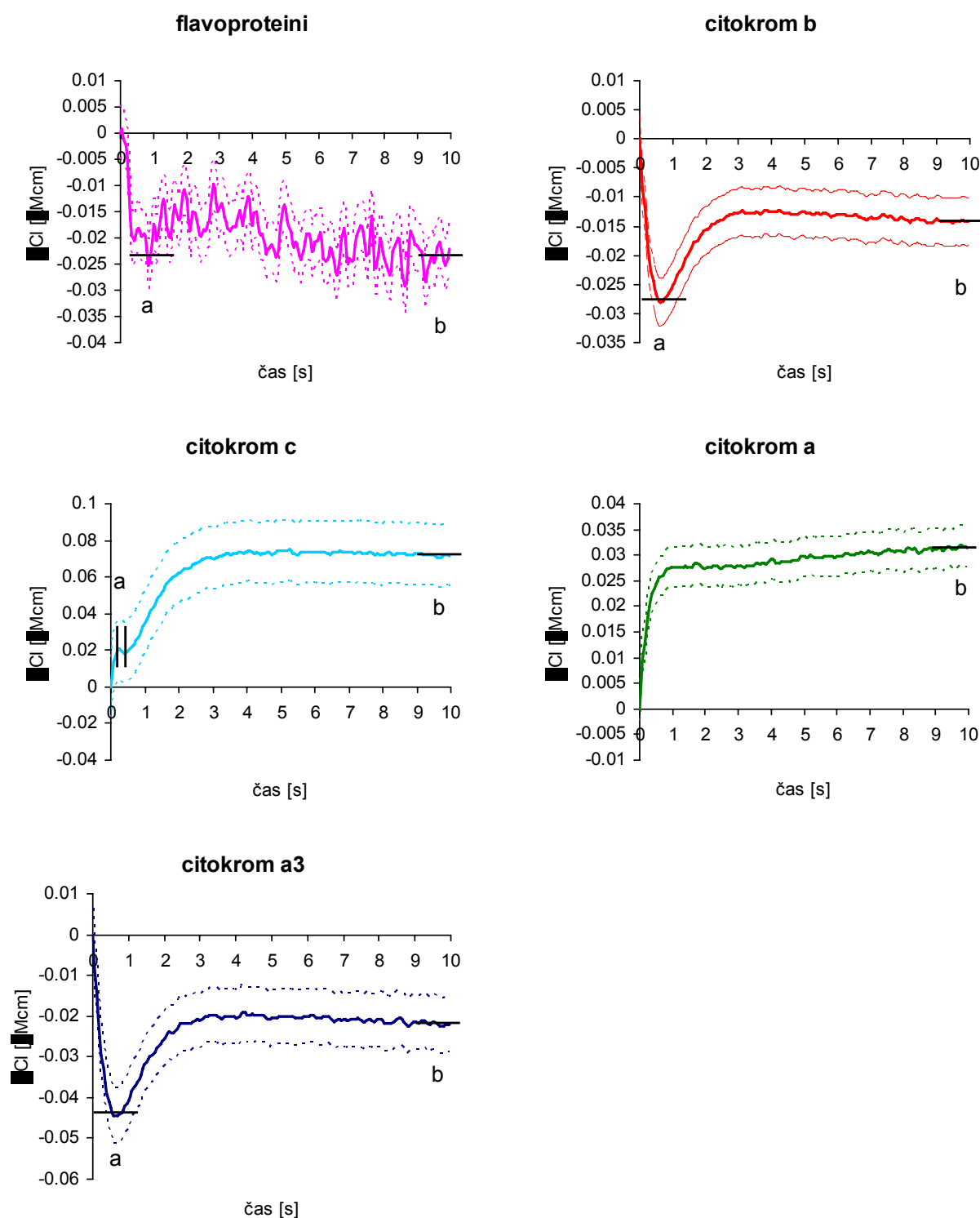
Slika 12: Povprečje časovnih potekov sprememb koncentracije reducirane oblike flavoproteinov in citokromov b, c, a, in a_3 vseh 15 muh.

Slika prikazuje povprečje časovnih potekov sprememb v koncentraciji reducirane oblike elementov dihalne verige pri vseh 15 muhah. Vzporedni prekinjeni črti, ki spremljata glavno, prikazujeta meje ene standardne napake ($\pm$ s.e.m.). Vsi časovni poteki se začnejo pri 0, ker je bilo to referenčno (mirovno) stanje ob začetku osvetljevanja. Ob osvetlitvi se citokrom c in citokrom a reducirata, flavoproteini ter citokrom b in a_3 pa se oksidirajo.

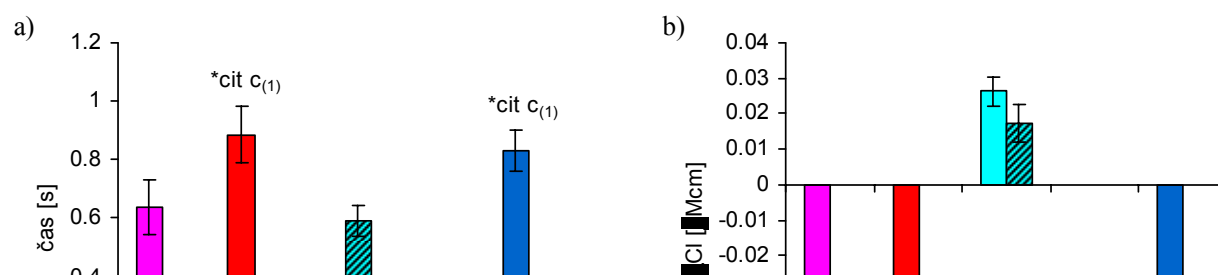
Pri citokromu b in a_3 opazimo na začetku oksidacijski tranzient. Do tega pojava pride tudi pri flavoproteinih, vendar le pri 6 muhah. Tranzient pomeni neko prehodno kratkotrajno spremembo, po kateri se odgovor lahko vrne na začetno stanje ali pa se ustali na nivoju različnem od začetne točke. Slednja možnost je značilna za naše odgovore, saj se po začetnem tranzientu, kar pomeni približno po 2 s od začetka osvetlitve, sprememba koncentracije reducirane oblike vseh treh omenjenih nosilcev ustali na nivoju med maksimumom tranzienta in izhodiščem. Citokrom c se ob aktivaciji reducira. Signal citokroma c je kombinacija citokroma c_1 kompleksa III notranje mitohondrijske membrane in prostega prenašalca elektronov citokroma c, ki se nahaja v medmembranskem prostoru. Zato je časovni potek najverjetneje seštevek časovnih potekov spremembe koncentracije reducirane oblike obeh citokromov c. Ta oblikuje značilen prevoj v začetnem delu krivulje, z izraženima lokalnima maksimumom in minimumom. Citokrom a se v začetku hitro reducira, tranzient ni prisoten. Prav tako kot pri flavoproteinih, citokromu b in citokromu a_3 , se tudi krivulji citokroma a in c nato ustalita na določenem nivoju.

4.1.1 Numerično vrednotenje parametrov časovnih potekov

Za vrednotenje (kvantifikacijo) in primerjavo smo izbrali naslednje parametre: čas in amplitudo tranzientov (slika 13a) ter amplitudo spremembe koncentracij reducirane oblike elementov dihalne verige ob koncu osvetlitve (slika 13b). Točke na posameznih zapisih časovnih potekov, so bile določene na podlagi subjektivne presoje.



Slika 2: Časovni potek spremembe koncentracije reduciranih oblik posameznih elementov dihalne verige v času osvetlitve. Z vodoravnimi črticami in črko a so označeni maksimalne amplitude tranzientov pri flavoproteinih ter citokromu b in a₃ oziroma maksimum in minimum prevoja pri citokromu c, z vodoravnimi črticami nad črko b pa stanje vseh pigmentov po 10 s osvetlitve. Črtkana črta nad in pod glavno črto označuje standardno deviacijo.



Slika 14: Primerjava parametrov časovnih potekov sprememb koncentracije reduciranih oblik posameznih elementov dihalne verige v času osvetlitve. a) Čas maksimuma tranzientov elementov dihalne verige oz. maksimuma in minimuma prevoja pri citokromu c. Z zvezdico nad stolpcem je označeno kateri od nosilcev so si za primerjani parameter (čas tranzienta) med seboj statistično različni. Oznaka cit $c_{(1)}$ predstavlja vrednost parametra ob maksimumu prevoja, cit $c_{(2)}$ pa ob njegovem minimumu. b) Spremembe koncentracij reducirane oblike dihalnih pigmentov ob maksimumu tranzienta oz. prevoju pri cit c, kjer prvi stolpec predstavlja maksimum prevoja in drugi njegov minimum, c) koncentracija spremembe koncentracije reducirane oblike elementov dihalne verige po 10s osvetljevanja.

Na sliki 14 a vidimo, da vsi tranzienti dosežejo svoj maksimum v 1. sekundi, pri čemer se flavoproteini, citokrom b in a_3 oksidirajo, citokrom c pa se reducira. Vrednosti vseh parametrov s standardnimi deviacijami so podani v tabelah v prilogi 1.

Tranzient flavoproteinov doseže svoj maksimum po približno pol sekunde osvetljevanja. Takrat je sprememba koncentracije reducirane oblike (Δcl) - $0,045 \pm 0,015 \mu\text{Mcm}$ nosilca. Le-ta je bil prisoten pri 6-ih od skupno 15 muh. Po 10 s osvetlitve se je sprememba koncentracije reducirane oblike povečala na - $0,022 \pm 0,023 \mu\text{Mcm}$ flavoproteinov.

Tranzient citokroma b doseže svoj maksimum pri $0,89 \pm 0,36$ sekunde osvetlitve, pri čemer se koncentracija reducirane oblike spremeni za - $0,032 \pm 0,005 \mu\text{Mcm}$. Po 10 s osvetlitve je vrednost Δcl - $0,015 \pm 0,011 \mu\text{Mcm}$.

Citokrom c se ob osvetlitvi reducira. Vendar je redukcija večstopenjski proces z značilnim prevojem, zaradi prej omenjenega dejstva, da signal predstavlja seštevek signalov citokroma c in citokroma c_1 . Do prevoja pride po približno po 0.5 sekunde, in sicer je čas lokalnega maksimuma prevoja 0.35 ± 0.11 sekunde, čas minimuma pa 0.59 ± 0.14 sekunde. Na vrhu prevoja Δcl doseže vrednost $0.026 \pm 0.011 \mu\text{Mcm}$ citokroma. Nato se ta delno oksidira (minimum prevoja), kar pomeni $0.017 \pm 0.014 \mu\text{Mcm}$ reducirane oblike citokroma c glede na začetno stanje. Nato zopet nastopi redukcija, in sicer je po 10. sekundi glede na začetno stanje reduciranega $0.082 \pm 0.012 \mu\text{Mcm}$ nosilca.

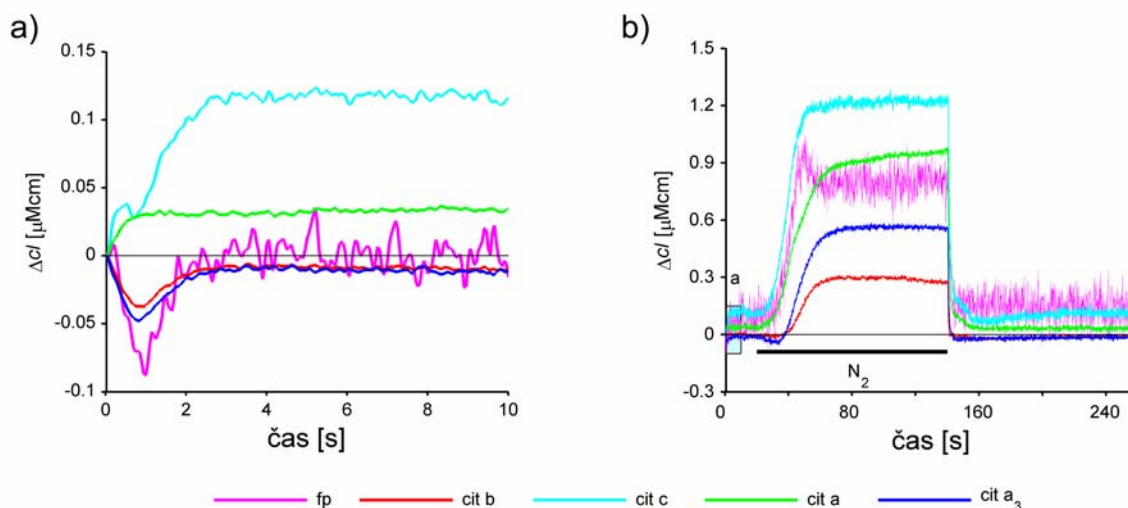
Citokrom a se najprej strmo reducira, nato pa po 1.45 ± 0.73 sekunde krivulja postane položnejša, redukcija poteka počasneje. Tranzient ni prisoten. Po 10 sekundah je vrednost Δcl $0.032 \pm 0.012 \mu\text{Mcm}$ pigmenta.

Citokrom a_3 se v začetku hitro oksidira. Vrh tranzienta se pojavi pri 0.83 ± 0.26 sekunde poteka, pri čemer se glede na začetno točko koncentracija reducirane oblike nosilca zmanjša za $0.047 \pm 0.014 \mu\text{Mcm}$ pigmenta. Ta se nato deloma reducira, po 10 sekundah je vrednost Δcl citokroma a_3 le še $-0.022 \pm 0.022 \mu\text{Mcm}$. Čas maksimuma tranzienta je statistično različen le med citokromom b in a_3 na eni in lokalnim maksimumom prevoja pri citokromu c na drugi strani (priloga 2). Vendar so oblika in časi elementov prevoja citokroma c najverjetneje posledica superpozicije dveh različnih odgovorov (citokromov c in c_1) ter zato ne morejo biti osnova za posplošeno sklepanje. Zato je lahko splošni zaključek, da do aktivacije dihalne verige pride najverjetneje pri celotni verigi sočasno in

ne zaporedno. Ali z drugimi besedami, na vse elemente verjetno deluje eden ali več zunanjih dejavnikov in ne gre le za preprosto kinetično sklopitev serije encimskih reakcij.

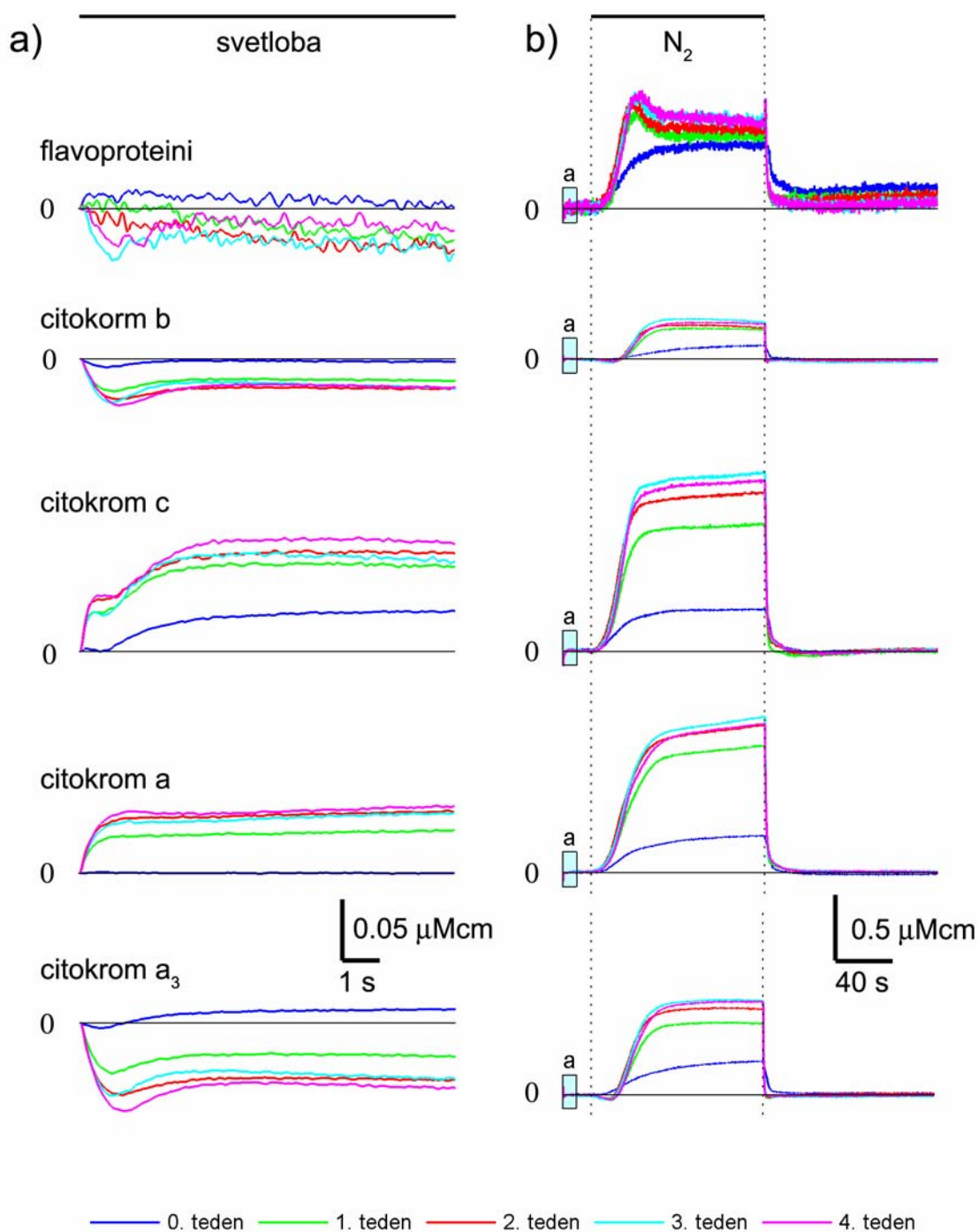
4.2 Časovni poteki odzivov dihalne verige na osvetlitev pri različno starih muhah

Meritve smo izvajali po enakem protokolu na dan izlega iz pupe ter 7., 14., 21. in 28. dan po izlegu. V tem delu poskusov smo za meritve porabili vsak teden 10 muh. Za oceno količine dihalnih pigmentov oziroma maksimalne spremembe redukcijskega stanja dihalnih pigmentov smo ob koncu protokola živali dali za 2 minuti v čisto N_2 atmosfero. Maksimalna amplituda spremembe koncentracije reducirane oblike je namreč proporcionalna koncentraciji posameznega dihalnega pigmenta ob predpostavki, da so v mirovnem stanju dihalni pigmenti v primerljivem redox stanju pri različnih živalih.



Slika 15: Primer časovnih potekov spremembe koncentracije reducirane oblike merjenih elementov dihalne verige pri eni 21 dni stari muhi ob 10 s osvetlitve v atmosferskih pogojih (graf a) in časovni poteki pri isti muhi ob vzpostavitvi N_2 atmosfere (graf b). Pravokotnik pod črko a zaobjema prvih 10s poteka, ko muha še ni bila izpostavljena dušiku. Pravokotnik ustreza območju prikazanem na grafu A. Z njim smo želeli prikazati kolikšne so spremembe koncentracije reducirane oblike nosilcev v atmosferskih pogojih glede na te spremembe v dušikovi atmosferi, kjer so nosilci maksimalno reducirani.

Iz dobljenih meritev smo najprej izračunali povprečje časovnih potekov sprememb koncentracij reducirane oblike za posamezen element dihalne verige vseh 10 muh v posameznih tednih. To sliko smo nato primerjali s sliko časovnih potekov Δcl za posamezen pigment ob osvetlitvi v posameznih tednih v dušikovi atmosferi (slika 16 b). Iz te primerjave sta postali razvidni dve dejstvi. Prvo je bilo to, da so spremembe Δcl v atmosferskih pogojih glede na tiste v dušiku zelo majhne in drugo, da se koncentracija pigmentov dihalne verige s starostjo spreminja, saj se tudi v dušiku izmerjene vrednosti Δcl posameznih nosilcev spreminjajo glede na starost muhe.



Slika 16: Časovni poteki spremembe koncentracije reducirane oblike posameznih elementov dihalne verige ob osvetlitvi po tednih, kjer grafi pod črko a) prikazujejo potek v atmosferskih pogojih, pod črko b) pa potek za isti element v dušikovi atmosferi. Pravokotnik pod črko a) zaobjema prvih 10s poteka, ko muha še ni bila izpostavljena dušiku. Pravokotnik ustreza območju prikazanemu na grafu na levi strani.

a) Flavoproteini

Na sliki opazimo, da se v tednu 0 flavoproteini ob osvetlitvi reducirajo in ostanejo reducirani vseh 10 s. V 1. in 2. tednu po izlegu pa se slika spremeni. V začetku osvetlitve se tudi v tem primeru reducirajo, nato pa se začnejo oksidirati in po približno 3,5 sekundah krivulja oriše negativne vrednosti na y osi, in sicer se nosilci do konca osvetlitve počasi oksidirajo. V 3. in 4. tednu pa se v časovnem poteku flavoproteinov pojavi oksidacijski tranzient, sledi delna redukcija, nato pa zopet zelo počasna oksidacija vse do zadnje s osvetlitve. Na desnem grafu, ki prikazuje spremembo redoks potenciala flavoproteinov, ko so bili ti v dušiku, vidimo da se amplituda odgovora s starostjo muhe povečuje.

b) Citokrom b

Na zgornji sliki opazimo, da je oksidativni tranzient citokroma b precej manjši na dan izlega muh kot v naslednjih tednih življenja. Tudi po 10 s osvetlitve je sprememba koncentracije reducirane oblike pigmenta pri prvi meritvi precej manjša od vseh naslednjih. Enako velja tudi za meritve v dušiku.

c) Citokrom c

V tednu 0 opazimo, da se citokrom c v začetku osvetlitve oksidira. Po prevoju pride do postopne redukcije, ki poteka vseh 10 s osvetlitve, in sicer se v tem času reducira večja količina pigmenta, kot se je na začetku oksidirala. Po prvem tednu se citokrom c začne reducirati že takoj ob začetku osvetlitve. Tako ostane tudi v preostalih meritvah. Na sliki opazimo tudi, da je ob različnih tednih prevoj različno izrazit oziroma drugačne oblike, kar je posledica tudi dejstva, da le-ta ni bil prisoten pri vseh muhah.

d) Citokrom a

Pri citokromu a v tednu 0 praktično ni spremembe v redoks stanju pigmenta. Po enem tednu pa temu ni več tako. V prvih dveh tednih po izlegu sprememba koncentracije reducirane oblike citokroma a po 10 s osvetljevanja narašča, medtem ko v zadnjih 2 tednih življenja muhe ostane na približno enaki ravni.

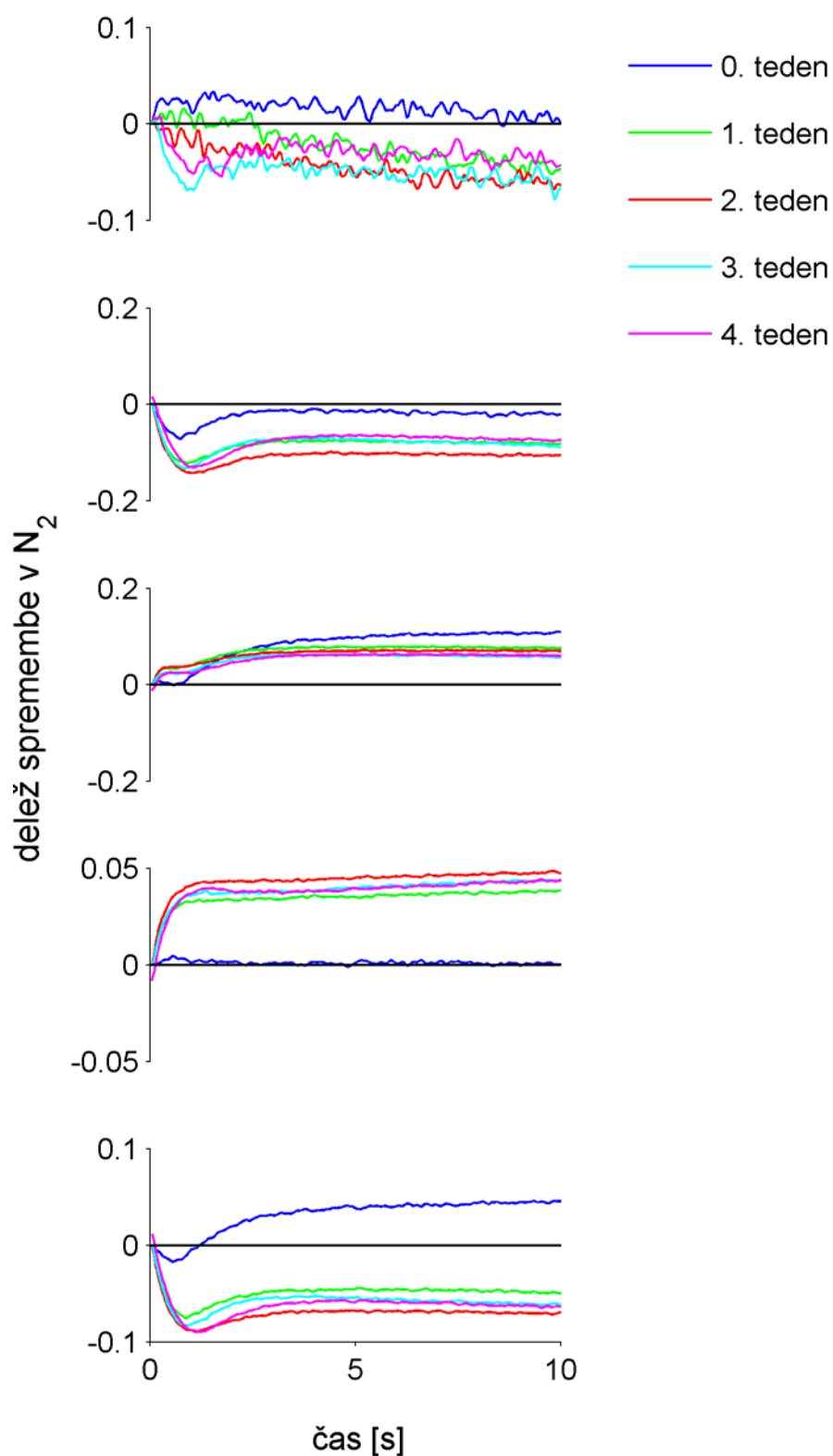
e) Citokrom a_3

Na sliki časovnih potekov citokroma a_3 vidimo, da se amplituda tranzienta v prvih 2 tednih po izlegu muhe povečuje, po tretjem tednu ostane na približno enakem nivoju kot po 2. tednu, v zadnjem tednu življenja pa se še malo poveča. Po začetnem tranzientu se v tednu 0 pigment reducira nad izhodiščno točko in zavzame pozitivne vrednosti. Pri ostalih tednih po tranzientu prav tako pride do delne redukcije, vendar pa ta ne preseže začetne točke. Torej je po 10 s osvetljevanja pigment pri 1 dan starih muhah glede na začetno stanje reduciran, pri ostalih starostih pa je oksidiran. Stopnja oksidacije po 10 s ne narašča sorazmerno s starostjo muh.

4.2.1 Primerjava časovnih potekov redoks stanj normiranih na maksimalno spremembo v N_2 atmosferi

Zato da bi izločili spremembe koncentracije reducirane oblike pigmentov na račun spremembe same koncentracije pigmentov v notranji membrani mitohondrijev ob staranju muhe, smo delili dobljene vrednosti posameznega nosilca (Δcl_n) med osvetlitvijo po času v atmosferskih pogojih z maksimumom istega nosilca v N_2 ($\Delta cl_{n(N_2 \max)}$); enačba 11).

$$P_n = \frac{\Delta cl_n}{\Delta cl_{n(N_2 \max)}} \quad (11)$$



Slika 17: Časovni poteki sprememb koncentracij reducirane oblike elementov dihalne verige normiranih na maksimum v N₂ vseh 10 muh po tednih .

Na grafu s časovnimi poteki Δcl flavoproteinov normiranih na N_2 , ni opaziti bistvenih razlik z nenormiranimi časovnimi poteki Δcl za isti nosilec.

Na grafu s časovnimi poteki Δcl citokroma b v različnih tednih normiranega na dušik opazimo v primerjavi z nenormiranimi nekaj razlik. Tranzient v 2. tednu meritev ima večjo amplitudo kot tranzient po 3 tednih. Po 10 s osvetlitve opazimo, da je delež spremenjene koncentracije reducirane oblike glede na maksimum v dušiku največji pri starosti 2 tednov, najmanjši je bil izmerjen na dan izlega, v preostalih meritvah pa je bil nekje vmes in praktično enak.

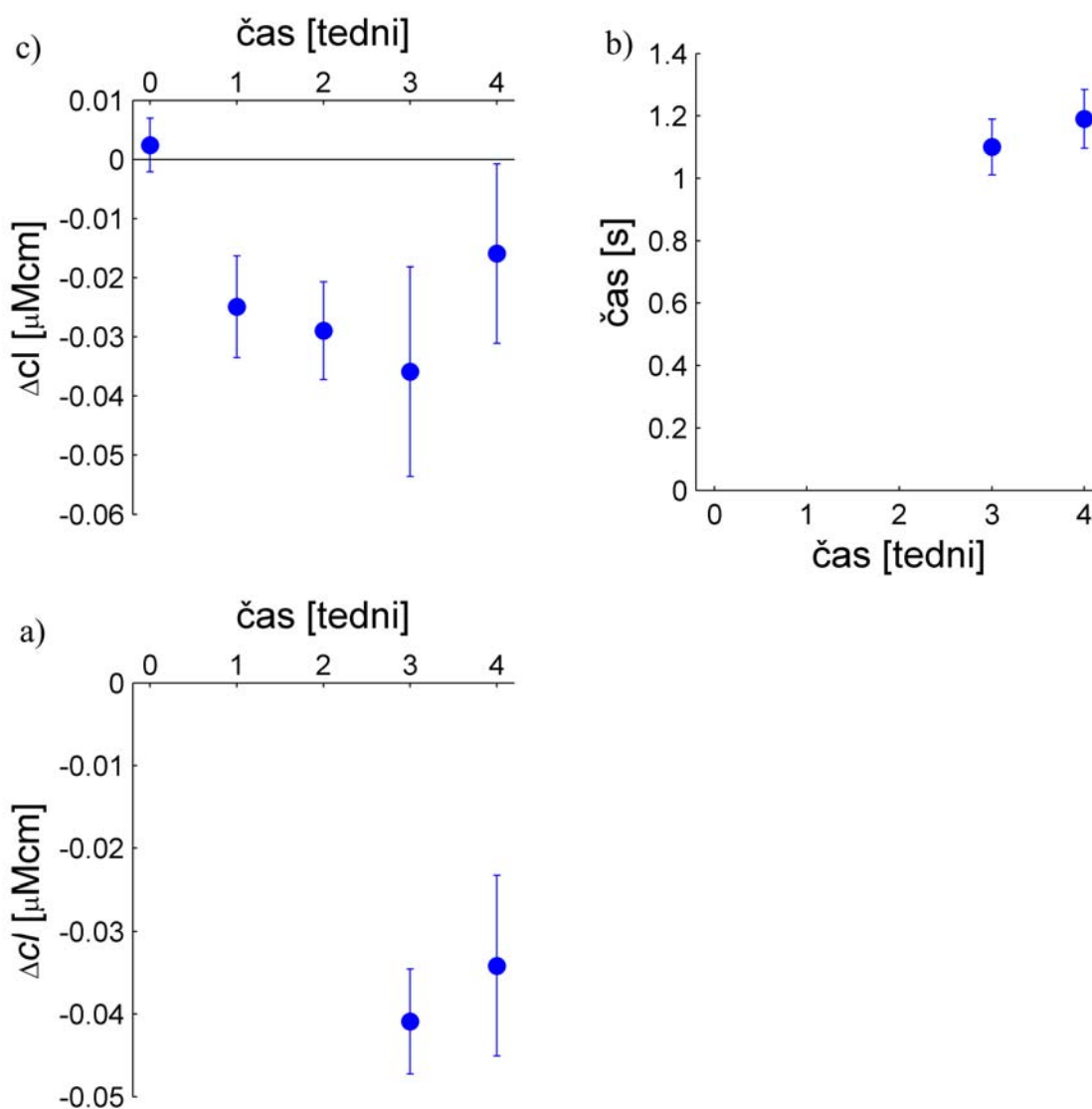
Tudi pri citokromu c opazimo določene razlike med surovimi meritvami in meritvami normiranimi na N_2 . V tednu 0 je glede na ostale tedne po 10 s osvetljevanja delež spremenjene koncentracije reduciranega citokroma c glede na vrh v dušiku največji. Sledi mu delež izmerjen po enem tednu, deleža končne reducirane oblike po dveh in štirih tednih sta približno enaka, najmanjši pa pripada meritvi po treh tednih.

Pri citokromih a in a_3 ni videti bistvenih razlik med nenormiranimi in normiranimi časovnimi poteki.

4.2.2 Numerično vrednotenje parametrov časovnih potekov posameznih elementov dihalne verige pri različni starosti muh.

V nadaljevanju smo primerjali spremembe istih parametrov, s katerimi smo karakterizirali odgovore dihalnih pigmentov (sliki 13 in 14). Izrisali smo grafe, s katerimi smo želeli prikazati spreminjanje posameznih izmerjenih parametrov s staranjem. Obenem smo naredili tudi statistično analizo, da bi ugotovili, kdaj razlike postanejo statistično značilne. Za analizo smo uporabili metodo analize variance (ANOVA) s konzervativno – Bonferronijevo korekcijo za večkratne primerjave. Vrednosti za posamezen parameter pri različni starosti muh, ki so med seboj značilno različne, smo na spodnjih grafih označili z zvezdico.

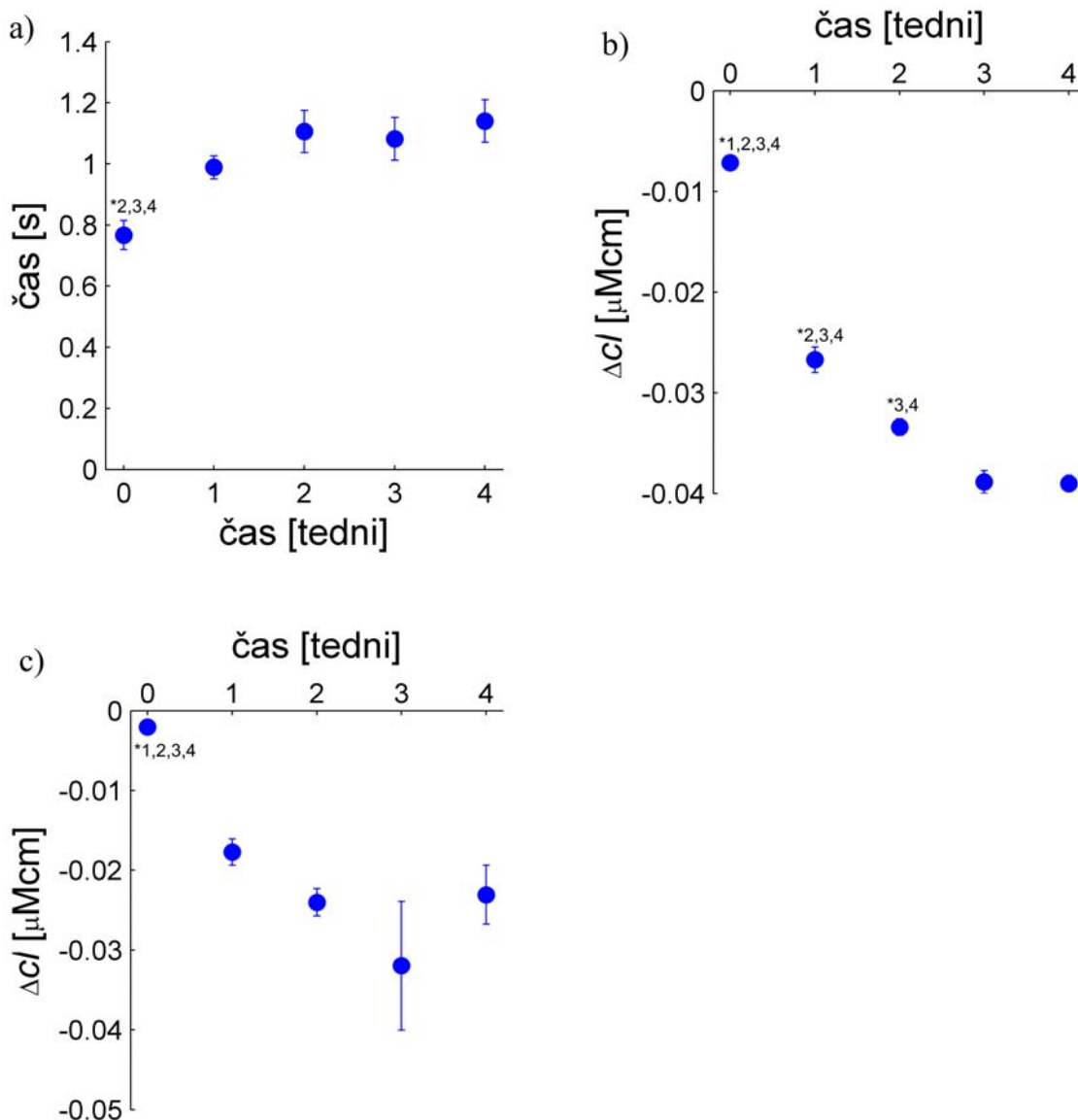
a) Flavoproteini



Slika 18: a) Čas maksimuma tranzientov flavoproteinov po tednih, b) sprememba koncentracije reducirane oblike, ko je tranzient dosegel svoj maksimum, c) sprememba koncentracije reducirane oblike flavoproteinov po 10 s osvetlitve.

Kot že omenjeno pri flavoproteinih tranzient opazimo šele po treh tednih od izlega muh. Tranzient doseže maksimum v obeh tednih približno ob istem času. Tudi amplitudi maksimuma tranzienta v obeh tednih nista značilno različni. Po 10 s osvetlitve na grafu opazimo razliko v koncentraciji reducirane oblike nosilca med tednom 0 in tedni 1, 2 in 3, vendar pa je analiza variance (priloga 2, tabela 11) pokazala, da vrednosti niso značilno različne.

b) Citokrom b

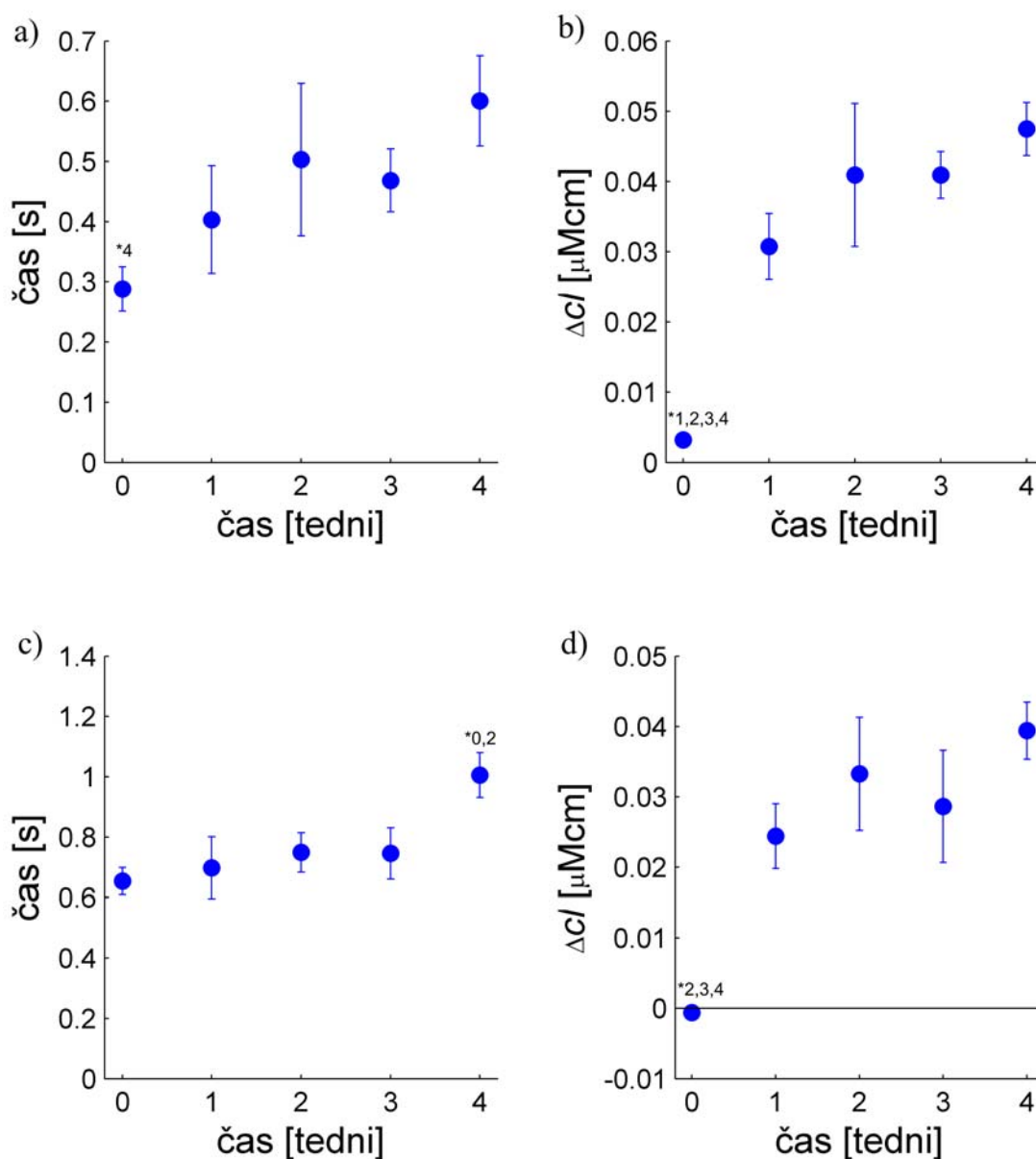


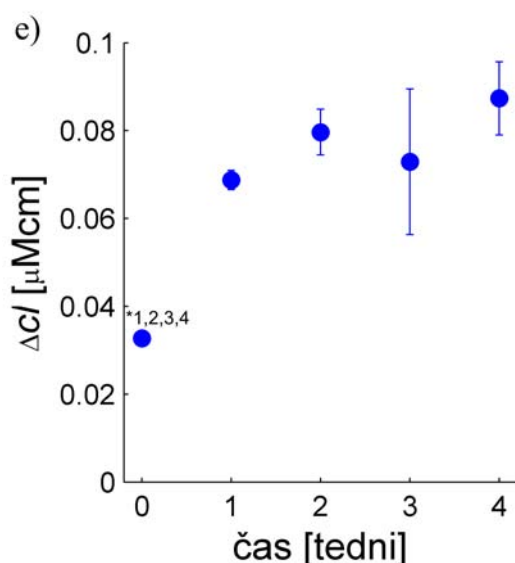
Slika 19: a) Čas maksimuma tranzientov citokroma b po tednih, b) sprememba koncentracije reducirane oblike nosilca, ko je tranzient dosegel svoj maksimum, c) sprememba koncentracije reducirane oblike citokroma b po 10 s osvetlitve. Vrednosti za posamezen parameter časovnega poteka, ki so med sabo značilno različne, so na grafu označene z zvezdico.

Čas tranzienta je na dan izlega statistično različen (krajši) od časa maksimuma tranzienta pri starosti muhe 2, 3 in 4 tedne. Amplituda tranzienta do 3. tedna starosti narašča, v zadnjem tednu pa ostane praktično nespremenjena. Sprememba koncentracije reducirane oblike pigmenta po 10 s osvetljevanja se med 1. in 2. meritvijo poveča, saj je vrednost ΔcI

izmerjena na dan izlega značilno različna od vrednosti izmerjenih po 1., 2., 3., in 4. tednu. Med ostalimi vrednostmi amplitud ni značilnih razlik.

c) Citokrom c

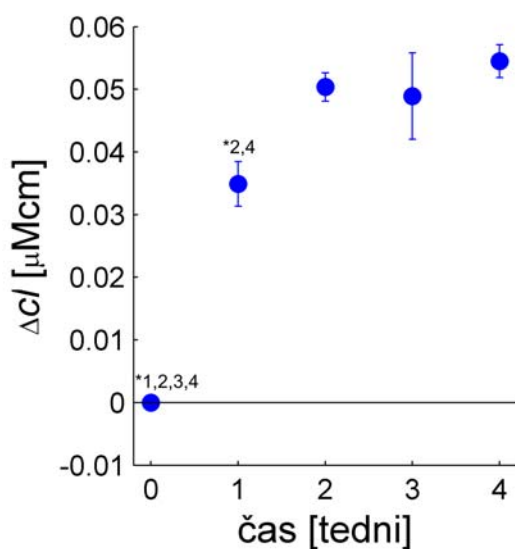




Slika 20: a) Čas maksimuma prevoja citokroma c po tednih, b) vrednosti spremembe koncentracije reducirane oblike, ko je prevoj dosegel svoj maksimum po tednih, c) čas minimuma prevoja citokroma c po tednih, d) vrednosti spremembe koncentracije reducirane oblike pigmenta ob minimumu prevoja po tednih, e) vrednosti spremembe koncentracije reducirane oblike po 10 s osvetlitve. Vrednosti za posamezen parameter časovnega poteka, ki so med sabo značilno različne, so na grafu označene z zvezdico.

Ker prevoj ni bil opazen pri vseh muhah, so v grafu, ki kaže amplitude in čas prevoja, upoštevane le tiste muhe, kjer se je ta pojavil. Statistično signifikantna je razlika v času maksimuma prevoja med meritvijo na dan izlega muh iz pupe in meritve po 4 tednih od izlega. Amplituda maksimuma prevoja se v prvem tednu od izlega muhe poveča. Vrednosti za ta parameter izmerjene po 1., 2., 3. in 4. tednu pa niso statistično različne. Minimum prevoja nastopi v prvih 3 tednih po izlegu ob približno istem času po začetku osvetlitve (~0.7s), medtem ko po 4 tednih minimum prevoja nastopi nekoliko kasneje (~1s). Amplituda minimuma s starostjo narašča, statistično signifikantne so razlike med vrednostjo izmerjeno v 0. tednu in 2., 3. ter 4. tednu. Sprememba koncentracije reducirane oblike citokroma c po 10 s osvetlitve se med 1. meritvijo (0. teden) in 2. (1. teden) poveča, razlike med vrednostmi 2. (1. teden) in ostalih meritev (2., 3. in 4. teden) niso statistično značilne.

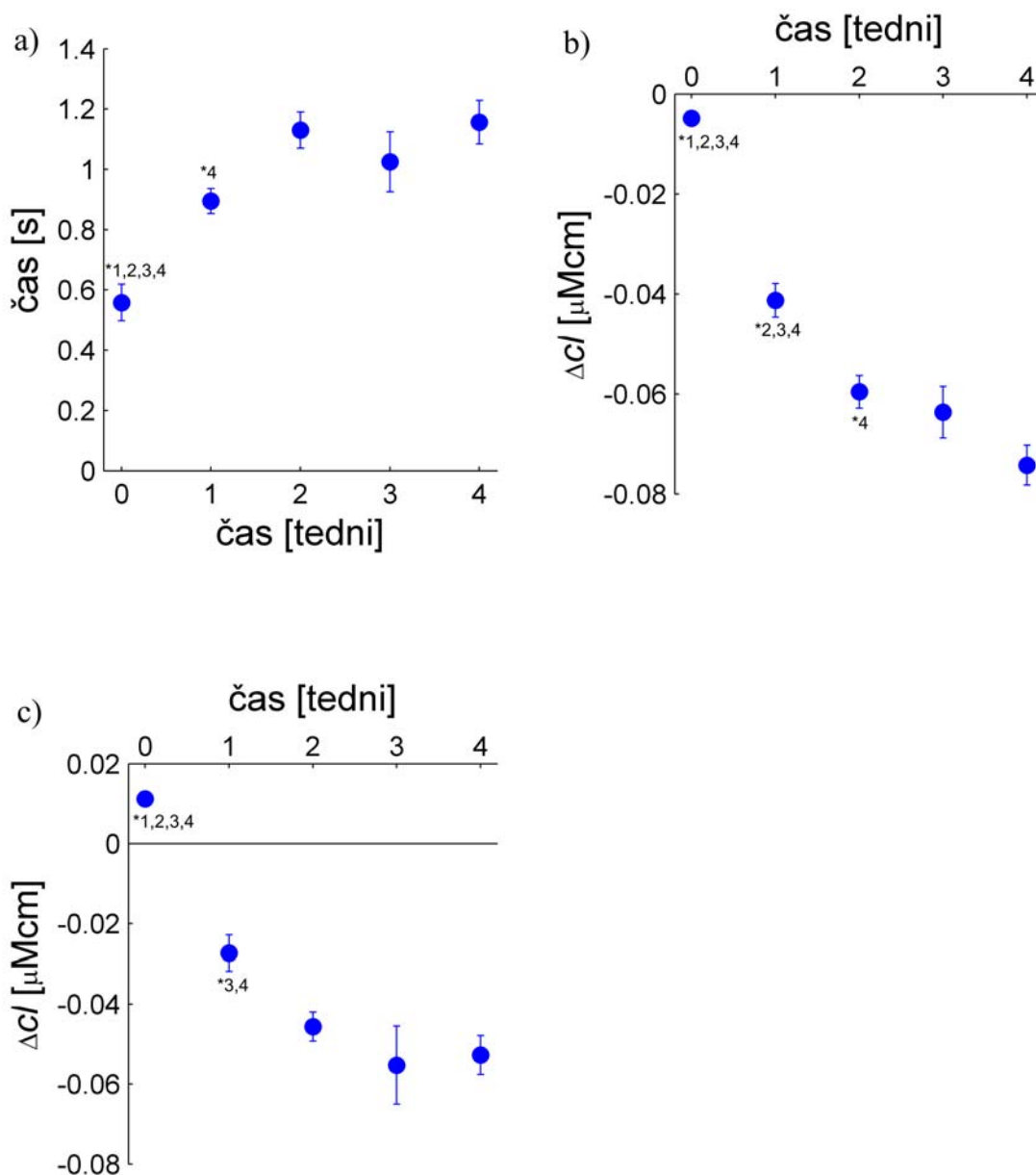
d) Citokrom a



Slika 21: Koncentracija reducirane oblike citokroma a po 10 s osvetlitve, podan s standardnimi napakami. Vrednosti za posamezen parameter časovnega poteka, ki so med sabo značilno različne, so na grafu označene z zvezdico.

Kot je razvidno že iz grafa časovnih potekov za citokrom a pri različni starosti muh, tudi zgornji graf potrjuje, da se sprememba koncentracije reducirane oblike pigmenta po 10 s osvetljevanja bistveno povečuje le prvih 14 dni. Razlike v amplitudi izmerjene v 2. 3. in 4. tednu med sabo niso značilno različne.

e) Citokrom a_3



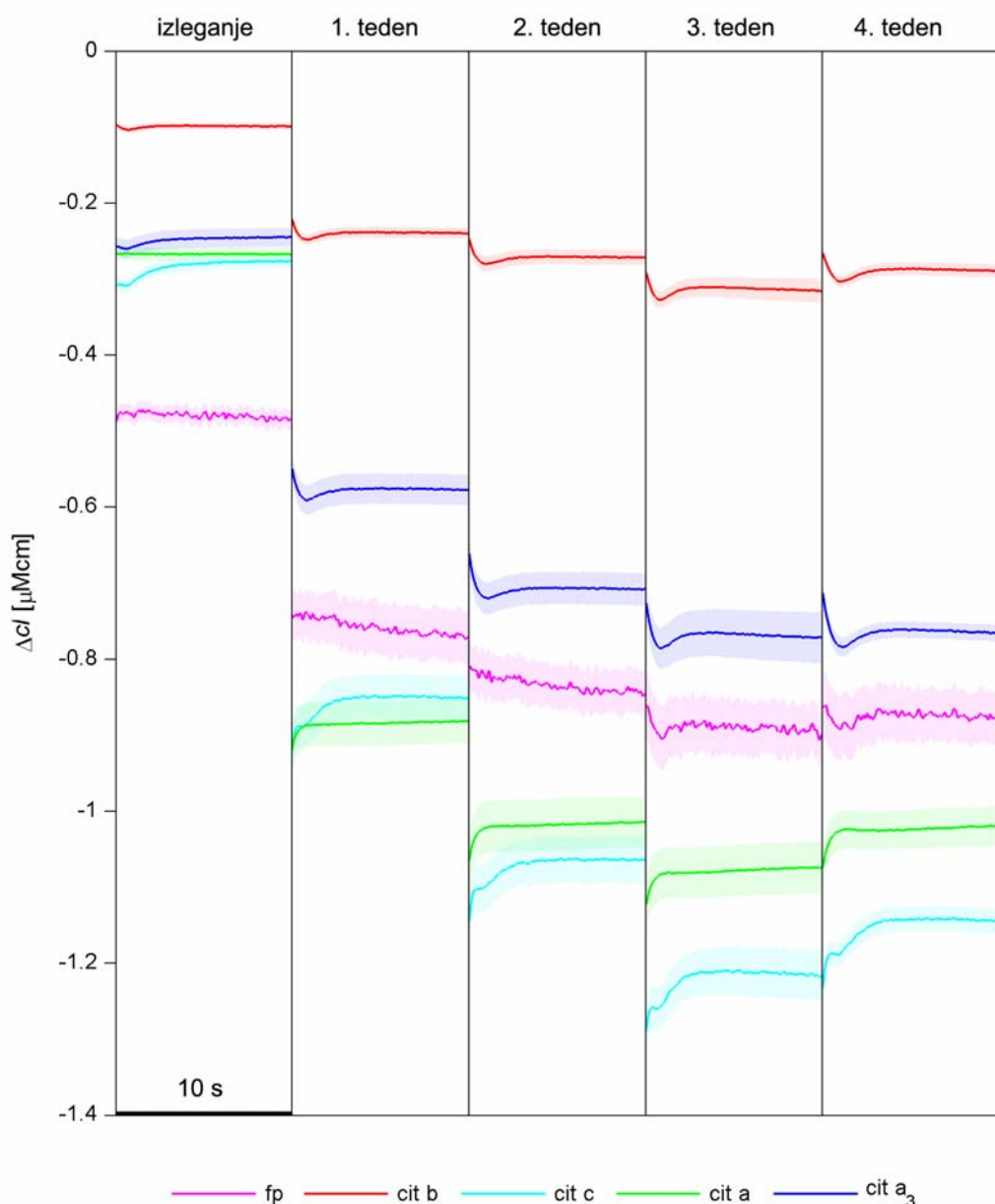
Slika 22: a) Čas maksimuma tranzienta citokroma a_3 v posameznih tednih, b) sprememba koncentracije reducirane oblike, ko je tranzient dosegel svoj maksimum po tednih, c) sprememba koncentracija reducirane oblike citokroma a_3 po 10 s osvetlitve glede na starost muhe. Vrednosti za posamezen parameter časovnega poteka, ki so med sabo značilno različne, so na grafu označene z zvezdico.

Tranzient doseže svoj maksimum v tednu 0 značilno hitreje kot v preostalih tednih. Tudi čas tranzienta v 1. tednu in 4. sta značilno različna. V amplitudi tranzienta pride do značilnih razlik ob staranju muhe. Ta v prvih dveh tednih narašča, med tednom 2 in 3 ni značilnih sprememb. Tudi vrednosti izmerjene v 2. in 4. tednu sta med sabo značilno različne. Po 10 s osvetlitve je sprememba koncentracije reducirane oblike citokroma a_3 1 dan starih muh pozitivna, v nadaljnjih meritvah pa dobi vedno bolj negativne vrednosti. Značilno so različne njene vrednosti med 0. in vsemi ostalimi tedni ter med 1. in zadnjima tednoma.

4.2.3 Časovni poteki sprememb koncentracij reduciranih oblik dihalnih pigmentov pri različno starih muhah

Z obzirom na to, da je bilo redoks stanje nosilcev elektronov v našem primeru na začetku poskusov nekje vmes med popolnoma reducirano in popolnoma oksidirano obliko, nas je nadalje zanimalo, v kolikšni meri se elementi dihalne verige med osvetlitvijo oksidirajo glede na maksimalno reducirano obliko. Vrednosti spremembe koncentracije reducirane oblike maksimalno reduciranih nosilcev smo dobili, ko smo dali muho v dušik in tako odvzeli končni akceptor elektronov kisik. Nato smo od časovnih potekov spremembe koncentracije reducirane oblike posameznih nosilcev izmerjenih v atmosferskih pogojih med osvetlitvijo (Δcl_n) pri različni starosti muhe odšteli maksimalne spremembe izmerjene za isti nosilec v N_2 ($\Delta cl_{n(N_2)max}$):

$$\Delta cl_n = \Delta cl_{n(atm)} - \Delta cl_{n(N_2)max} \quad (8)$$



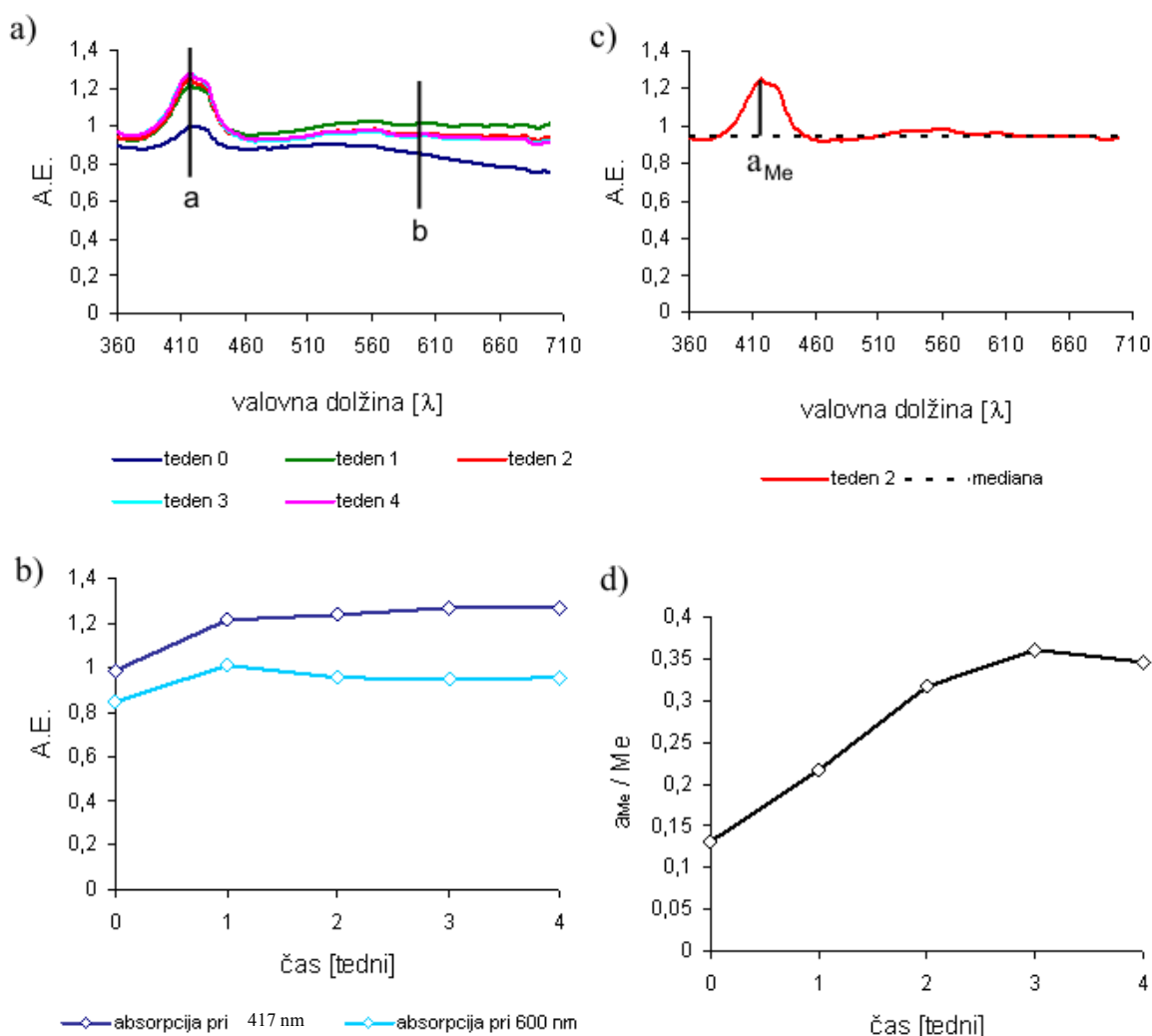
Slika 23: Razlika med časovnimi poteki spremembe koncentracije reducirane oblike posameznih elementov dihalne verige v atmosferskih pogojih in v dušikovi atmosferi med osvetljevanjem pri različni starosti muhe.

Pri komaj izleženih muhah si po absolutni velikosti amplitude spremembe koncentracije reducirane oblike elementov ob prehodu v dušik sledijo po naslednjem zaporedju: cit b < cit a₃ < cit a < cit c < fp. Po 1. tednu pa se to zaporedje spremeni, in sicer izgleda takole: cit b < cit a₃ < fp < cit c < cit a. V 2. tednu pride še do zamenjave med citokromom c in a: cit b < cit a₃ < fp < cit a < cit c. Tako zaporedje nato ostane tudi v 3. in 4. tednu.

Na grafu opazimo splošen trend večanja amplitude razlike med redoks stanjem v atmosferskih pogojih in v dušiku s staranjem muhe pri vseh elementih dihalne verige. Prav tako opazimo tudi, da se pri nekaterih elementih verige s staranjem nekoliko povečuje tudi amplituda tranzienta. Največje spremembe v razliki so opazne med ravno izleženimi muhami in 1. tednom, kar bi lahko pomenilo, da se v tem času povečuje koncentracija elementov dihalne verige v mitohondrijih mušjih fotoreceptorjev ali/in spremembe samih struktur ob zorenju fasetnega očesa (spremembe dioptričnega aparata, količina vode, razvitost traheol, itd.) in ne ob »visoki« starosti, kot smo pričakovali na začetku. Med 1. in 2. tednom se sprememba v razliki poveča pri citokromu a_3 , citokromu a in citokromu c. Na koncu 3. tedna opazimo povečanje razlike le še pri citokromu a in citokromu c.

4.2.4 Analiza absorpcijskih spektrov fasetnega očesa različno starih muh

Dejstvo, da molekule citokromov b, c, a, a_3 in flavoproteini spremenijo barvo, ko prenesejo elektron oz. preidejo iz reduciranega v oksidirano stanje ali obratno, ima veliko eksperimentalno vrednost. Razlika med absorpcijskimi spektri obeh redoks stanj nam je tako omogočila, da smo s pomočjo refleksijske diferenčne spektroskopije merili mitohondrijsko aktivnost *in vivo*. Nadalje pa nas je zanimalo tudi, če se absorpcijski spektri razlikujejo med sabo pri različno starih muhah. Tako smo preko oblike teh spektrov in razmerja med absorpcijskim vrhom ter vrednostjo mediane absorpcije pri različno starih muhah dobili pomembno informacijo o tem, ali se s starostjo spreminja koncentracija pigmentov v notranji mitohondrijski membrani ali pa gre za spremembe optičnega aparata oziroma za kombinacijo obeh.



Slika 24: a) Absorpcijski spektri različno starih muh. Črta nad črko a predstavlja presek spektrov pri absorpcijskem vrhu pri valovni dolžini 417 nm, črta nad črko b pa presek spektrov pri okoli 600 nm, b) sprememba absorpcije pri absorpcijskem vrhu pri $\lambda = 417$ nm (temno modra črta) in pri $\lambda \sim 600$ nm (svetlo modra črta) v odvisnosti od starosti muhe, c) absorpcijski spekter 14 dni starih muh, pri čemer je s črtkano črto označena mediana, s črto nad a_{Me} pa razlika med vrednostjo absorpcije pri absorpcijskem vrhu in mediano, d) razmerje med a_{Me} in vrednostjo mediane pri različno starih muhah.

Na grafu a z absorpcijskimi spektri opazimo, da se amplituda absorpcije pri absorpcijskem vrhu glede na osnovni nivo s starostjo muh povečuje. Razlika je najbolj opazna med 1 dan in 1 teden starimi muhami, nato pa je ta vedno manj izrazita. Pri valovnih dolžinah v rdečem delu spektra pride tudi do splošnega premika spektrov pri muhah starih 1 in 7 dni. Da bi bolj nazorno prikazali razlike v absorpcijskih spektrih oči različno starih muh pri teh

dveh kritičnih točkah, torej pri absorpcijskem vrhu ($\lambda=417$ nm) in pri valovni dolžini ~ 600 nm, kjer se spektri začnejo razhajati, smo izrisali graf b. Na njem vidimo, da se v prvem tednu po izlegu absorpcija pri $\lambda = 417$ nm precej poveča, v naslednjih tednih pa so spremembe v absorpciji zelo majhne, vendar ta še vedno počasi narašča. Pri $\lambda \sim 600$ nm je bila najmanjša absorpcija izmerjena pri komaj izleženih muhah, največja pa pri 1 teden starih muhah. Absorpcija pri 600 nm se v 2. tednu življenja muhe nekoliko zmanjša nato pa se s starostjo praktično ne spreminja več. Veliko več kot same absolutne vrednosti absorpcije pa nam pove razmerje med vrhom absorpcije ter srednjo vrednostjo le-te. Ker je v našem primeru porazdelitev vzorca asimetrična, smo namesto povprečja izračunali mediano. Količine, uporabljene za izračun omenjenega razmerja, smo prikazali na grafu c. Vrednosti razmerja med a_{Me} in mediano pri različno starih muhah pa smo prikazali na grafu d. Tu vidimo, da to razmerje prve 3 tedne od izvalitve muh narašča, v zadnjem tednu pa se nekoliko zmanjša.

Ker so vrednosti omenjenega razmerja pri različni starosti muh različne, in ker fasetno oko ostaja skozi celo življenje muhe približno enake velikosti (torej se optična pot verjetno ne spreminja kaj dosti) lahko sklepamo, da se koncentracija dihalnih pigmentov v notranji mitohondrijski membrani mušjega fotoreceptorja pri procesu staranja spreminja. Ta se v prvih 3 tednih od izlega povečuje, v zadnjem tednu življenja pa se nekoliko zmanjša.

Splošni premik absorpcije pri komaj izleženih in 1 teden starih muhah pri valovnih dolžinah večjih od 550 nm pa kaže na to, da v prvem tednu od izlega prihaja tudi do spremembe optičnih lastnosti mušjega fasetnega očesa, ki so verjetno posledica njegovega dozorevanja.

5 RAZPRAVA

Ugotovili smo:

1. Časovni poteki oksidacije in redukcije posameznih dihalnih pigmentov – flavoproteinov ter citokromov b, c, a in a_3 ob fiziološki obremenitvi s svetlobo se med seboj razlikujejo. Citokroma c in a se glede na začetno stanje reducirata, ostali nosilci pa se oksidirajo. Na začetku osvetlitve pri časovnem poteku flavoproteinov, citokroma b in a_3 opazimo oksidacijski tranzient, pri citokromu c pa prevoj. Vse spremembe redoks stanj so zelo majhne in se dogajajo praktično istočasno, kar kaže na tako imenovani paralelni mehanizem aktivacije sistema oksidativne fosforilacije v mitohondrijih mušjih fotoreceptorjev.
2. S staranjem muhe se časovni poteki spreminjajo. Spremeni se amplituda sprememb ob obremenitvi, pri flavoproteinih in delno pri citokromu c pa tudi njihova oblika. Največje razlike so opazne, v nasprotju z našimi pričakovanji, v prvem tednu po izlegu muh iz pupe in ne v visoki starosti.

5.1 Mehanizem aktivacije dihalne verige v mušjih fotoreceptorjih glede na časovne poteke sprememb redoks stanja nosilcev v dihalni verigi med osvetlitvijo.

Ob osvetlitvi pride do spremembe redoks stanja dihalnih pigmentov, česar posledica je sprememba absorpcije, iz katere smo nato lahko izračunali časovni potek sprememb koncentracije reducirane oblike nosilcev glede na stanje ob začetku osvetlitve. Flavoproteini in citokroma b ter a_3 se ob aktivaciji oksidirajo, citokroma a in c pa se reducirata. Na sliki s časovnimi poteki (slika 12) opazimo tudi začetni tranzient pri vseh elementih razen pri citokromu c, za katerega je značilen prevoj, in citokromu a, kjer tranzient ni prisoten. Če pogledamo kaj se dogaja znotraj kompleksov, kjer se nahajata po

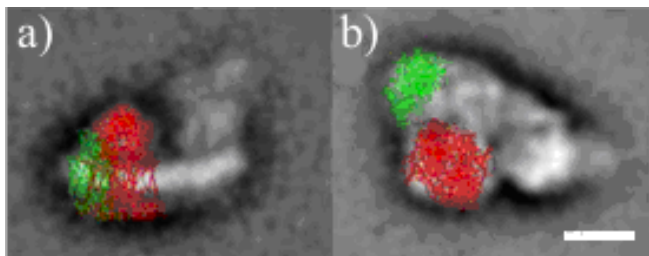
dva od proučevanih nosilcev skupaj (kompleks III in IV), opazimo podobno dogajanje v obeh kompleksih. V membranskem kompleksu III se citokrom b ob aktivaciji najprej oksidira, nato pa delno reducira, citokrom c pa se ob aktivaciji reducira. Ravno tako se v kompleksu IV citokrom a reducira, citokrom a_3 pa se kot citokrom b v kompleksu III najprej oksidira, nato pa delno reducira. Vendar pa je treba omeniti, da je ugotovljen časovni potek za citokrom b kombinacija obnašanja ob osvetlitvi dveh hemov b (b_L in b_H), časovni potek citokroma c pa je kombinacija časovnega poteka spremembe koncentracije reducirane oblike citokroma c_1 in citokroma c, od katerih se le citokrom c_1 nahaja znotraj kompleksa III, kar interpretacijo nekoliko zakomplicira.

Vendar pa vseeno lahko rečemo, da morda ob osvetlitvi in posledično aktivaciji mitohondrijev mušjih fotoreceptorjev v kompleksih III in IV pride do odstranitve neke notranje blokade in posledično prenosa elektronov med posameznimi citokromi (hemi) na podoben način. Možno razlago za to, kaj v kompleksu III predstavlja to »blokado« oz. zakaj se citokrom b v začetni fazi aktivacije najprej oksidira in šele nato delno reducira, medtem ko se citokrom c takoj reducira, bi lahko izluščili iz rezultatov raziskave avtorjev Orii in Miki (1997), ki pravijo, da semiubikinon v kompleksu III lahko, pri pogoju, da sta oba nosilca v oksidiranem stanju (v našem primeru je začetno redoks stanje obeh nosilcev nekje med popolnoma oksidirano in reducirano obliko, kar pomeni, da sta delno oksidirana) odda elektron hemu b_L , šele ko je Rieske-jev center že reduciran (in posledično citokrom c_1), saj naj bi bila ta reakcija termodinamično bolj ugodna. Tako naj bi železo-žveplov protein, katerega stanja z našimi meritvami sicer nismo mogli spremljati, deloval kot nekakšno z redoks stanjem nosilcev povezano stikalo znotraj kompleksa III.

Zanimivo je dejstvo, da se tranzienti oziroma prevoj pri citokromu c zgodijo po približno enakem času od začetka osvetlitve, kar kaže na hkratno aktivacijo vseh kompleksov dihalne verige in ne zaporedno. Eno od možnih razlag za ta pojav predstavljajo rezultati raziskav avtorjev Schagger in Pfeiffer (2000) na mitohondrijih kvasovk in sesalcev. Ti predlagajo, da kompleksi niso razporejeni v lipidnem dvosloju notranje membrane naključno, ampak naj bi tvorili supramolekularne komplekse, po katerih naj bi bil substrat voden direktno od enega encima k drugemu. Ti superkompleksi pa naj bi tvorili mrežo

imenovano respirasom. V govejih srčnih mitohondrijih so tako potrdili obstoj superkompleksov s sestavo: I_1III_2 in

$I_1III_2IV_1$ (Schafer s sod., 2006)



Slika 25: Rentgenska slika strukture superkompleksa $I_1III_2IV_1$. a) Pogled od strani, b) od zgoraj (iz intermembranskega prostora), pri čemer je dimer kompleksa III prikazan z rdečo barvo, kompleks IV pa z zeleno. Svetleje je označen del kompleksa I, ki se nahaja v matriksu. Črta v desnem spodnjem kotu predstavlja 10 nm (prirejeno po Schafer s sod., 2006)

Druga lastnost amplitude tranzientov pa je ta, da pri vseh nosilcih predstavlja zelo majhno spremembo koncentracije reducirane oblike nosilcev, v primerjavi s spremembo koncentracije ko so ti popolnoma reducirani v dušiku. Po začetnem tranzientu pa praktično pri vseh elementih dihalne verige amplituda spremembe koncentracije reducirane oblike doseže neko vrednost, kjer se ohranja z minimalnimi nihanji vseh 10 s osvetlitve. Te tri lastnosti skupaj bi bile lahko eksperimentalni dokaz teoretičnemu kinetičnemu modelu mehanizma paralelne aktivacije oksidativne fosforilacije, ki ga je predlagal Korzeniewski (2001). Ta govori o vzporedni in znotraj obsega realnih možnosti živega organizma enakomerni aktivaciji vseh kompleksov dihalne verige, čemur v našem konkretnem primeru ustreza približno enak čas tranzientov elementov dihalne verige, in posledično minimalne variacije v koncentraciji vmesnih metabolitov, kar se kaže v majhni amplitudi sprememb reducirane oblike nosilcev ob osvetlitvi. Zelo pomemben dejavnik, ki bi lahko hkrati aktiviral celotno verigo predstavlja sprememba membranskega potenciala oziroma elektrokemijskega gradienta na notranji mitohondrijski membrani.

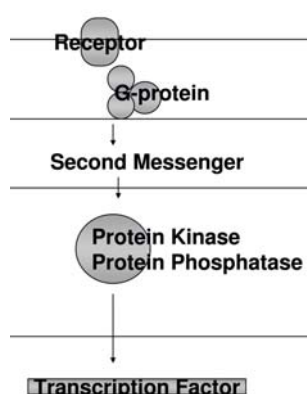
5.2 Časovni poteki odzivov dihalne verige na osvetlitev ob staranju muh

Navarro s sodelavci (2007) poročajo, da pride ob staranju do selektivnega zmanjšanja encimske aktivnosti kompleksa I in IV v izoliranih mišjih in podganjih mitohondrijih. Rezultati naših poskusov pa v nasprotju s pričakovanji tega na prvi pogled ne potrjujejo. Pri različno starih muhah pride pri časovnih potekih spremembe reducirane oblike posameznih nosilcev do največjih sprememb v prvih tednih od izlega iz pupe in ne pri postaranih muhah. To je razvidno tako iz primerjave vrednosti amplitude tranzienta pri različno starih muhah, kot tudi iz amplitude odgovora po 10 s osvetlitve, pri nekaterih nosilcih pa celo v času tranzienta (cit. a₃ in b). Pri tem je potrebno seveda omeniti, da smo z našimi meritvami spremljali dinamično stanje in ne neposredno encimske učinkovitosti. Kljub temu pa se pri analizi ne da spregledati dejstva, da se koncentracija dihalnih pigmentov s staranjem najverjetneje povečuje. Iz primerjave časovnih potekov za posamezne nosilce v dušikovi atmosferi, kjer so ti maksimalno reducirani, lahko tako razberemo, da koncentracija dihalnih pigmentov v notranji membrani mitohondrijev fotoreceptorjev muhe v prvih treh tednih od izlega narašča, v zadnjem tednu pa se nekoliko zmanjša (le pri flavoproteinih ni razlike med 3. in 4. tednom). Ker pa bi bili vzroki za povečano spremembo koncentracije reducirane oblike nosilcev ob staranju lahko v popolnoma drugih mehanizmi, kot so npr. spremembe optičnih lastnosti fasetnega očesa ob dozorevanju (spremembe dioptričnega aparata, razvitost traheol, itd.), morebitne spremembe fototransdukcijskega aparata in posledično različna aktivacija sinteze raznih regulatornih proteinov, itd., smo med sabo primerjali tudi absorpcijske spektre oči različno starih muh. Razmerje med absorpcijskim vrhom in mediano je potrdilo naše sklepanje, da je glavni vzrok v spremembi koncentracije reducirane oblike pigmentov ob staranju ravno sprememba njihove koncentracije. Vendar pa v rdečem delu absorpcijskega spektra pride v prvih dveh tednih od izlega tudi do splošnih premikov absorpcije, ki pa nakazujejo, da imajo pri spremembah časovnih potekov elementov v začetnem obdobju po izlegu vsaj delno vlogo tudi drugi omenjeni mehanizmi. Pri tem gre bodisi za razliko v koncentraciji neke snovi s širokim absorpcijskim vrhom ali pa za različen prispevek Rayleigh-jevega

sipanja na endomembranskih sistemih pri mladih in pri starih muhah. Pri Rayleigh-jevem sipanju se namreč svetloba krajših valovnih dolžin sipa bolj kot dolgovalovna svetloba.

Kljub temu pa na sliki s časovnimi poteki normiranimi na maksimalno spremembo v dušiku (slika 17), s čimer smo izločili spremembe koncentracije reducirane oblike nosilcev zaradi spremembe njihove koncentracije ob staranju, še vedno opazimo razlike v časovnih potekih pri različno starih muhah za posamezen nosilec. Ta razlika je daleč največja med časovnimi poteki 1 dan in 1 teden starih muh, nato pa je čedalje manj izrazita. To dejstvo nakazuje možnost razvoja celičnega respiratornega sistema, povezano z obremenitvijo in s fototransdukcijskim sistemom, saj smo muhe gojili v 12h/12h dnevno-nočnem režimu.

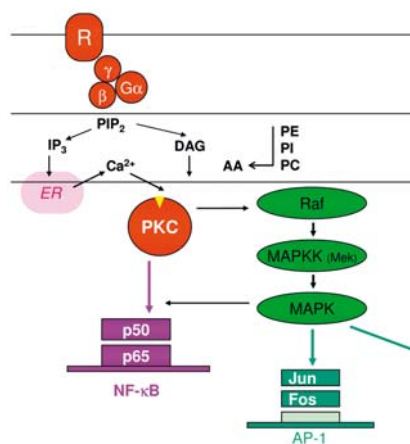
V svojem pregledu Boneh (2006) namreč poroča, da imajo pri regulaciji oksidativne fosforilacije pomembno vlogo različni signalni transdukcijski mehanizmi, posredovani preko sekundarnih sporočevalcev. Ugotovili so vpletenost več različnih sek. sporočevalcev, med katerimi naj bi bila pri mitohondrijski transdukciji signalov najpomembnejša kalcij in cAMP. Ostali predstavniki so še ceramid, ROS, NO, NRS. V zadnjem času je bilo tudi ugotovljeno, da različne kinaze in fosfataze, vpletene v signalno transdukcijo, fosforilirajo oz. defosforilirajo in na ta način aktivirajo oz. deaktivirajo jedrne transkripcijske faktorje, ki aktivirajo oz. inhibirajo izražanje genov.



Slika 26: Splošna struktura signalne transdukcijske poti, kjer aktivacija receptorja sproži razpad G-proteina in posledično aktivacijo sekundarnih sporočevalcev. Ti nato aktivirajo Protein kinaze in protein fosfataze, ki nadalje delujejo na transkripcijske faktorje in tako na sintezo proteinov. (prirejeno po Boneh, 2006).

Po Ca-fosfolipidni signalni transdukcijski poti, ki je prisotna v mušjih fotoreceptorjih, razpadni produkt molekule PIP_2 - DAG poveča afiniteto od kalcija odvisnih podvrst PKC (proteinska kinaza C) za sekundarni sporočevalec (Ca^{2+}). Ta jih aktivira že pri manjših citosolnih koncentracijah. Ob mirovnih pogojih se PKC večinoma nahaja v citosolu. Po aktivaciji z zunajceličnem signalom pa pride do njene translokacije v membranske kompartmente celice. Ta prenos regulira skupina adaptorskih proteinov z imenom RACK (receptorji za aktivirane C-kinaze). Aktivirana PKC nato aktivira različne transkripcijske faktorje in posledično sintezo proteinov. Ugotovili so, da ima aktivacija različnih podvrst PKC različne vplive na sistem oksidativne fosforilacije. Aktivirana PKC- α naj bi zmanjšala aktivnost ATP- sintaze in posledično produkcijo ATP. PKC- ε pa naj bi na drugi strani povzročila dvakratno povečanje aktivnosti kompleksa IV. Pri kvasovkah so ugotovili, da od PKC odvisen mehanizem povzroči inhibicijo kompleksa III in nastanek ROS.

Poleg kalcija tudi številni drugi sekundarni sporočevalci in regulatorji PKC podvrst regulirajo sistem oksidativne fosforilacije (sfingozin, ROS, NO, RNS). Ta kinazna družina bi teoretično lahko potencialno predstavljala ključni regulator funkcije sistema oksidativne fosforilacije (Boneh, 2006).



Slika 27: Kalcijevo- fosfolipidna in PKC pot signalne transdukcije (prirejeno po Boneh, 2006).

Mehanizem oksidativne fosforilacije je zelo kompleksen proces in zelo veliko vprašanj je še odprtih. Tudi mehanizmi njegove regulacije in spremembe le-teh pri procesu zorenja oziroma staranja organizma so še vedno precej dobro zaviti v tančico skrivnosti.

V nadaljnjem delu bi bilo zanimivo muhe vzgojiti v popolni temi in na gojišču s srcem, ki vsebuje manj vitamina A. Na ta način, bi po dveh poteh zmanjšali obremenitev očesa – tako s Ca^{2+} neposredno kot tudi posredno preko morebitnega delovanja PKC. V tem primeru, bi bilo možno, da je sinteza dihalnih pigmentov manjša, preprosto zato, ker so potrebe po ATP manjše. Tako bi pričakovali, da se bodo odzivi teh muh na svetlobno obremenitev, ki sproži enako močno depolarizacijo, razlikovali od teh izmerjenih v tem delu. Tak rezultat bi nedvomno potrdil povezavo med fototransdukcijo in obremenitvijo očesa ter sintezo in/ali delovanjem mitohondrijskih proteinov.

6 POVZETEK

Z uporabo dinamične diferenčne refleksne spektroskopije smo želeli preučiti dinamiko odziva mitohondrijske dihalne verige (flavoproteinov ter citokromov b, c, a in a_3) na fiziološko obremenitev (osvetlitev) v očesu belooke mutante muhe rdečeglave brenčičke (*Calliphora vicina* - chalky) in od starosti odvisne spremembe le-te. Izvajali smo meritve diferenčnih absorpcijskih spektrov oči ter meritve časovnih potekov spremembe redoks stanja posameznih nosilcev pri različnih atmosferskih pogojih (v zraku ali dušiku) ob osvetlitvi pri različni starosti muh in jih med sabo primerjali.

Ugotovili smo, da so časovni poteki oksidacije in redukcije posameznih dihalnih pigmentov ob fiziološki obremenitvi med seboj različni. Citokrom c in citokrom a se glede na začetno stanje reducirata, ostali nosilci pa se oksidirajo. Ob osvetlitvi pri časovnem poteku flavoproteinov, citokroma b in a_3 pride do začetnega oksidacijskega tranzienta, pri citokromu c pa do značilnega prevoja. Tranzienti nastopijo takoj ob začetku osvetlitve in pri vseh omenjenih nosilcih praktično istočasno. Amplitude spremembe koncentracije reducirane oblike nosilcev glede na maksimalno reducirano obliko v dušiku so ob aktivaciji dihalne verige ob osvetlitvi zelo majhne in se po začetnem tranzientu večinoma ustalijo na določenem nivoju. Vse te ugotovitve kažejo v prid teoretičnemu kinetičnemu modelu z imenom paralelni mehanizem aktivacije sistema oksidativne fosforilacije.

Ugotovili smo, da se s staranjem muhe časovni poteki spremembe koncentracije reducirane oblike posameznih nosilcev ob fiziološki obremenitvi spreminjajo. Do sprememb je prišlo tako v atmosferskih pogojih kot tudi v dušiku. Skladno s tem so bili različni tudi absorpcijski spektri oči ob različni starosti muh. Vendar pa so bile te razlike v nasprotju z našimi pričakovanji največje v začetnem obdobju od izlega iz pupe in ne pri postaranih muhah. Pokazali smo, da so te razlike najverjetneje posledica naraščanja koncentracije elementov dihalne verige notranje mitohondrijske membrane mušjih fotoreceptorjev v začetnem obdobju življenja adultnega osebka, in da zraven igrajo vlogo tudi drugi procesi, kot so mogoče spremembe v strukturi fasetnega očesa ob njegovem dozorevanju.

(spremembe dioptričnega aparata, razvitost traheol, količina vode, itd.) ter morebiti celo spremembe v fototransdukcijskih regulacijskih mehanizmi in sintezi proteinov.

7 VIRI

- Baumann, O. (1997). Biogenesis of surface fly domains in fly photoreceptor cells: fine-structural analysis of the plasma membrane and immunolocalization of Na⁺, K⁺ ATPase and α -spectrin during cell differentiation. *J. Comp. Neurol.* 382:429-442.
- Baumann, O. (2000). Distribution of ryanodine receptor Ca²⁺ channels in insect photoreceptor cells. *J Comp Neurol* 5: 421(3):347-61.
- Boneh, A. (2006). Review Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation by second messenger-mediated signal transduction mechanisms. *Cell. Mol. Life Sci.* 63 1236–1248.
- Brandt, U., Kersch, S., Drose, S., Zwicker, K., Zickermann, V. (2003). Minireview: Proton pumping by NADH:ubiquinone oxidoreductase. A redox driven conformational change mechanism? *FEBS Letters* 545, 9-17.
- Brookes, P. S., Yoon, Y., Robotham, J. L., Anders, M. W. and Sheu S. (2004). Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C817–C833.
- Carroll, J., Fearnley, I. M., Shannon, R. J., Hirst, J. and Walker, J.E. (2003). Analysis of the Subunit Composition of Complex I from Bovine Heart Mitochondria. *Molecular & Cellular Proteomics* 2:117–126.
- Chyb, S., Raghu, P., Hardie, R.C. (1999). Polyunsaturated fatty acids activate the *Drosophila* light-sensitive channels TRP and TRPL. *Nature* 397: 255-259.
- Crofts, A.,R. (2004). Review: Proton-coupled electron transfer at the Qo-site of the bc₁ complex controls the rate of ubihydroquinone oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1655: 77– 92.
- Čehovin, A. (2004). Dimamični odgovor elementov dihalne verige ob skočnih spremembah PO₂ pri muhah *Calliphora erythrocephala* in *Drosophila melanogaster*. Diplomsko delo, Ljubljana.
- DiMauro, S. (2004). Review: Mitochondrial diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1658: 80 – 88.
- Gadaleta, M. N., Connio, A., Pesce, V., Serena Lezza, A. M., Cantatore, P. (1998). Aging and mitochondria. *Biochimie* 80, 863-870.
- Gershon, D. (1999). The mitochondrial theory of aging: Is the culprit a faulty disposal system rather than indigenous mitochondrial alterations? *Experimental Gerontology* 34 613–619.
- Hamdorf, K., Hochstrate, P., Höglund, G., Burbach, B., Wiegand, U. (1988). Light activation of the sodium pump in blowfly photoreceptors. *J. Comp. Physiol. A* 162: 285-300.
- Hardie, R.C. (2001). Phototransduction in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biology* 204:3403-3409.
- Hardie, R.C., Raghu, P., Moore, S., Juusola, M., Baines, R.A., Sweeney, T. (2001). Calcium influx via TRP channels is required to maintain PIP₂ levels in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* 30: 149-159.

- Huang, F., Matthies, H. J. G., Speese, S. D., Smith, M. A., Broadie, K. (2004). Rolling blackout, a newly identified PIP2-DAG pathway lipase required for *Drosophila* phototransduction. *Nature neuroscience*, vol. 7, num. 10, October 2004.
- Hunte, C., Palsdottir, H., Trumpower, B.L. (2003). Minireview: Protonmotive pathways and mechanisms in the cytochrome bc1 complex. *FEBS Letters* 545: 39-46.
- Korzeniewski, B. (2001). Review: Theoretical studies on the regulation of oxidative phosphorylation in intact tissues. *Biochimica et Biophysica Acta* 1504: 31-45.
- Korzeniewski, B. (2007). Review: Regulation of oxidative phosphorylation through parallel activation. *Biophysical Chemistry*-04975.
- Kowald, A. (1999). The mitochondrial theory of aging: Do damaged mitochondria accumulate by delayed degradation? *Experimental Gerontology* 34: 605–612.
- Lah, L. (2002). Študij dinamike redoks stanj dihalnih pigmentov mušjega očesa in situ z dinamično diferenčno refleksno spektroskopijo. Diplomsko delo, Ljubljana.
- Lim, H., Bodmer, R., Perrin, L. (2006). *Drosophila* Aging 2005/06. *Exp Gerontol.* 41(12): 1213–1216.
- Linford, N. J., Schriener, S.E., Rabinovitch, P.S. (2006). Oxidative damage and aging: spotlight on mitochondria. *Cancer Res*; 66(5): 2497-2499.
- Meglič, A. (2004). Registracija spreminjanja parcialnega tlaka kisika v očesu rdečeglave brenčarke (*Calliphora vicina*) z amperometrično ogljikovo elektrodo. Diplomsko delo, Ljubljana.
- Montell, C. (1999). Visual transduction in *Drosophila*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15: 231-268.
- Navarro, A., Boveris, A. (2007). The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C670–C686.
- Nicholls, D. G. (2002). Mitochondrial function and dysfunction in the cell: its relevance to aging and aging-related disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34: 1372–1381.
- Nicholls, D.G., Budd, S.L. (2000). Mitochondria and neuronal survival. *Physiol. Rev.* 80: 316-360.
- Oberwinkler, J. in Stavenga D.G. (2000). Calcium imaging demonstrates colocalization of calcium influx and extrusion in fly photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 8578-8583.
- Oberwinkler, J. in Stavenga, D.G. (1998). Light dependence of calcium and membrane potential measured in blowfly photoreceptors in vivo. *J Gen Physiol* 112: 113-124.
- Orii, Y in Miki, T. (1997). Oxidation process of bovine heart ubiquinol-cytochrome c reductase as studied by stopped-flow rapid-scan spectrophotometry and simulations based on the mechanistic Q cycle model. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 272, No. 28, Issue of July 11, p. 17594–17604.
- Pangršič, T. (2001). Analiza faz povišane porabe kisika v očesu muhe (*Calliphora erythrocephala*-chalky). Diplomsko delo, Ljubljana.
- Sánchez-Martínez, A., Luo, N., Clemente, P., Adán, C., Hernández-Sierra, R., Ochoa, P., Fernández-Moreno, M. A., Kaguni, L. S., Garesse, R. (2006). Modeling human mitochondrial diseases in flies. *Biochimica et Biophysica Acta* 1757: 1190–1198.

- Sato, A., Nakada, K., Hayashi, J. (2006). Mitochondrial dynamics and aging: Mitochondrial interaction preventing individuals from expression of respiratory deficiency caused by mutant mtDNA. *Biochimica et Biophysica Acta* 1763: 473–481.
- Schafer E, Seelert H, Reifschneider NH, Krause F, Dencher NA, Vonck J. (2006). Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* 281: 15370–15375.
- Schagger, H., Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* 19, 1777-1783.
- Scheffer, I., E. (2001). A century of mitochondrial research: achievements and Perspectives. *Mitochondrion* 1 3-31.
- Stavenga, D.G. (1995). Insect retinal pigments: Spectral characteristics and physiological functions. V: *Progress in Retinal and Eye Res.* 15: 231-259. Elsevier Science Ltd, Velika Britanija.
- Tsacopoulos, M., Orkand, R.K., Coles, J.A., Levy, S., Poitry, S. (1983). Oxygen uptake occurs faster than sodium pumping in bee retina after a light flash. *Nature* 301: 604-606.
- Turrens, J.F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.*, 552.2, p. 335–344.
- Wei, Y., Lee, H. (2002). Oxidative Stress, Mitochondrial DNA Mutation, and Impairment of Antioxidant Enzymes in Aging. *Exp Biol Med* 227:671–682.
- Zaslavsky, D., Gennis, R.B. (2000). Review: Proton pumping by cytochrome oxidase: progress, problems and postulates. *Biochimica et Biophysica Acta* 1458 164-179.
- Zupančič, G. (2003). A method for dynamic spectrophotometric measurements in vivo using principal component analysis based spectral deconvolution. *Eur J Physiol* 447: 109-119.
- Žumer, K. (2004). Spremljanje oksidativnega metabolizma izolirane mišice z dinamično diferenčno optično spektroskopijo. Diplomsko delo, Ljubljana.

ZAHVALA

Zahvalila bi se svojemu mentorju Gregorju za uspešno vodenje od začetka do konca izdelave diplome in za neumorno odgovarjanje na vsa moja vprašanja, ki jim nikoli ni konca. Iskrena hvala tudi Andreju za vso pomoč in družbo pri izvedbi praktičnega dela in za dolge ure risanja kompliciranih grafov v Matlabu.

Hvala tudi vsem ostalim članom katedre za zoofiziologijo, da ste me sprejeli medse in vsak na svoj način prispevali k mojemu napredku in temu, da nikoli ni bilo dolgočas.

Zahvala gre tudi Urški Čepin za vso pomoč pri urejanju slik in oblikovanju končnega izgleda diplomskega dela.

Hvala moji družini, še posebno moji mamici, ki ima absolutno največ zaslug pri tem, da sem danes to, kar sem, pa tudi vsem prijateljem za vso podporo in predvsem zato, da je bil čas mojega študija v vseh pogledih prijetno in nepozabno doživetje.

Nenazadnje pa hvala tudi čistilki Nadi za vzpodbudne besede in odlično kavo ob dolgih urah merjenja in pisanja v laboratoriju.

Pa še hvala vsem muham, ki ste bile žrtvovane ob izdelavi moje naloge v višje namene znanosti, brez vas mi gotovo ne bi uspelo.

PRILOGA 1

Poleg vseh povprečnih vrednosti parametrov so podane zraven standardne deviacije.

1. Vrednosti parametrov časovnih potekov, pri čemer smo primerjali čas in amplitudo tranzientov oziroma maksimuma ($c_{(1)}$) in minimuma ($c_{(2)}$) prevoja pri citokromu c ter amplitudo spremembe koncentracij reducirane oblike elementov dihalne verige ob koncu osvetlitve.

Tabela 1:

	čas tranzienta	amplituda tranzienta [μMcm]	amplituda po 10s osvetljevanja [μMcm]
fp	0.638 ± 0.212	-0.045 ± 0.015	-0.022 ± 0.023188
cit b	0.886 ± 0.363	-0.032 ± 0.005	-0.015 ± 0.011
cit $c_{(1)}$	0.349 ± 0.106	0.026 ± 0.011	0.082 ± 0.012
cit $c_{(2)}$	0.593 ± 0.140	0.017 ± 0.014	
cit a			0.032 ± 0.012
cit a3	0.832 ± 0.263	-0.047 ± 0.014	-0.022 ± 0.022

2. Vrednosti parametrov časovnih potekov spremembe reducirane oblike posameznih elementov dihalne verige pri različno starih muhah.

Tabela 2: flavoproteini

	čas tranzienta	amplituda tranzienta [μMcm]	amplituda po 10s osvetljevanja [μMcm]
0. teden			0.002 ± 0.026
1. teden			-0.025 ± 0.026
2. teden			-0.029 ± 0.025
3. teden	1.100 ± 0.154	-0.041 ± 0.011	-0.036 ± 0.053
4. teden	1.190 ± 0.211	-0.034 ± 0.024	-0.016 ± 0.046

Tabela 3: citokrom b

	čas tranzienta [s]	amplituda tranzienta [μMcm]	amplituda po 10s osvetljevanja [μMcm]
0. teden	0.767 ± 0.143	-0.007 ± 0.002	-0.002 ± 0.002
1. teden	0.988 ± 0.112	-0.027 ± 0.004	-0.018 ± 0.005
2. teden	1.106 ± 0.206	-0.033 ± 0.002	-0.024 ± 0.005
3. teden	1.082 ± 0.198	-0.039 ± 0.003	-0.032 ± 0.023
4. teden	1.141 ± 0.210	-0.039 ± 0.002	-0.023 ± 0.011

Tabela 4: citokrom c

	čas maksimuma prevoja [s]	amplituda maksimuma prevoja [μMcm]	čas minimuma prevoja [s]	amplituda minimuma prevoja [μMcm]	amplituda po 10s osvetljevanja [μMcm]
0. teden	0.288 ± 0.097	0.003 ± 0.001	0.654 ± 0.119	-0.001 ± 0.002	0.033 ± 0.003
1. teden	0.403 ± 0.179	0.031 ± 0.009	0.698 ± 0.205	0.024 ± 0.009	0.069 ± 0.007
2. teden	0.503 ± 0.127	0.041 ± 0.014	0.7489 ± 0.092	0.033 ± 0.011	0.080 ± 0.016
3. teden	0.468 ± 0.117	0.041 ± 0.007	0.746 ± 0.208	0.029 ± 0.020	0.073 ± 0.050
4. teden	0.601 ± 0.184	0.047 ± 0.009	1.006 ± 0.182	0.039 ± 0.010	0.087 ± 0.025

Tabela 5: citokrom a

	amplituda po 10s osvetljevanja [μMcm]
0. teden	-4.9E-06 ± 0.002
1. teden	0.035 ± 0.011
2. teden	0.050 ± 0.007
3. teden	0.049 ± 0.021
4. teden	0.055 ± 0.008

Tabela 6: citokrom a₃

	čas tranzienta [s]	amplituda tranzienta [μMcm]	amplituda po 10s osvetljevanja [μMcm]
0. teden	0.558 ± 0.182	-0.005 ± 0.002	0.011 ± 0.003
1. teden	0.895 ± 0.125	-0.041 ± 0.010	-0.027 ± 0.014
2. teden	1.130 ± 0.179	-0.060 ± 0.010	-0.046 ± 0.011
3. teden	1.025 ± 0.298	-0.064 ± 0.016	-0.055 ± 0.028
4. teden	1.157 ± 0.216	-0.074 ± 0.012	-0.053 ± 0.015

3. Numerične vrednosti absorpcije ob absorpcijskem vrhu pri valovni dolžini 420 nm in 600 nm v odvisnosti od starosti muhe.

Tabela 7:

	pri vrednosti $\lambda = 417$ nm [A. E.]	pri vrednosti $\lambda = 600$ nm [A. E.]
0. teden	0.9889	0.845
1. teden	1.2089	1.0093
2. teden	1.2381	0.958
3. teden	1.2698	0.9429
4. teden	1.2687	0.9506

PRILOGA 2

Za določanje značilnih razlik med vrednostmi parametrov različnih nosilcev (tabela 8) oz. med vrednostmi parametrov za isti nosilec pri različno starih muhah smo uporabili analizo variance (ANOVA), korigirano s pomočjo Bonferronijeve korekcije. Z njim smo testirali hipotezo, da so povprečja parametrov pri nosilcih enaka. Korigirane verjetnosti ($k \cdot p$) manjše od 0.05 oz. $p < 0.005$ kažejo na značilne razlike med primerjanimi vzorci.

Tabela 8: Analiza razlik v času tranzienta flavoproteinov, citokromov b, a₃ in maksimuma (c₍₁₎) ter minimuma (cit c₍₂₎) prevoja citokroma c pri časovnem poteku spremembe koncentracije reducirane oblike teh elementov z intervalom zaupanja 95 % s pomočjo Bonferronijeve korekcije.

primerjava pigmentov	p	značilno različno
cit b - cit c ₍₁₎	< 0.0001	da
cit b - cit c ₍₂₎	0.014	ne
cit b - fp	0.057	ne
cit b - cit a ₃	0.578	ne
cit a ₃ - cit c ₍₁₎	<0.0001	da
cit a ₃ - cit c ₍₂₎	0.044	ne
cit a ₃ - fp	0.133	ne
fp - cit c ₍₁₎	0.047	ne
fp - cit c ₍₂₎	0.757	ne
cit c ₍₂₎ - cit c ₍₁₎	0.069	ne
Modificirana stopnja zaupanja	0.005	

Tabela 9: Analiza razlik v času tranzienta flavoproteinov različno starih muh z intervalom zaupanja 95 % s pomočjo Bonferronijeve korekcije.

primerjava časov	p	Značilno različno
4. teden - 3. teden	0.487	ne
Modificirana stopnja zaupanja	0.05	

Tabela 10: Analiza razlik v amplitudi tranzienta flavoproteinov različno starih muh z intervalom zaupanja 95 % s pomočjo Bonferronijeve korekcije.

primerjava amplitude	p	značilno različno
4. teden - 3. teden	0.624	ne
Modificirana stopnja zaupanja	0.05	

Tabela 11: Analiza razlik v amplitudi odgovora flavoproteinov po 10 s osvetljevanja različno starih muh z intervalom zaupanja 95 % s pomočjo Bonferronijeve korekcije.

primerjava amplitude	p	značilno različno
0. teden - 3. teden	0.021	ne
0. teden - 1. teden	0.040	ne
0. teden - 2. teden	0.057	ne
0. teden - 4. teden	0.259	ne
4. teden - 3. teden	0.221	ne
4. teden - 1. teden	0.337	ne
4. teden - 2. teden	0.422	ne
2. teden - 3. teden	0.668	ne
2. teden - 1. teden	0.873	ne
1. teden - 3. teden	0.788	ne
Modificirana stopnja zaupanja	0.005	

Tabela 12: Analiza razlik v času tranzienta citokroma b različno starih muh z intervalom zaupanja 95 % s pomočjo Bonferronijeve korekcije.

primerjava časov	p	značilno različno
4. teden - 0. teden	< 0,0001	da
4. teden - 1. teden	0.062	ne
4. teden - 3. teden	0.474	ne
4. teden - 2. teden	0.665	ne
2. teden - 0. teden	0.000	da
2. teden - 1. teden	0.146	ne
2. teden - 3. teden	0.767	ne
3. teden - 0. teden	0.000	da
3. teden - 1. teden	0.259	ne
1. teden - 0. teden	0.008	ne
Modificirana stopnja zaupanja:	0.005	

Tabela 13: Analiza razlik v amplitudi tranzienta citokroma b različno starih muh z intervalom zaupanja 95 % s pomočjo Bonferronijeve korekcije.

primerjava amplitud	p	značilno različno
0. teden - 4. teden	< 0,0001	da
0. teden - 3. teden	< 0,0001	da
0. teden - 2. teden	< 0,0001	da
0. teden - 1. teden	< 0,0001	da
1. teden - 4. teden	< 0,0001	da
1. teden - 3. teden	< 0,0001	da
1. teden - 2. teden	< 0,0001	da
2. teden - 4. teden	< 0,0001	da
2. teden - 3. teden	0.000	da
3. teden - 4. teden	0.913	ne
Modificirana stopnja zaupanja:	0.005	

Tabela 14: Analiza razlik v amplitudi odgovora citokroma b po 10 s osvetlitve različno starih muh z intervalom zaupanja 95 % s pomočjo Bonferronijeve korekcije.

primerjava amplitud	p	značilno različno
0. teden - 3. teden	< 0,0001	da
0. teden - 2. teden	< 0,0001	da
0. teden - 4. teden	0.000	da
0. teden - 1. teden	0.004	da
1. teden - 3. teden	0.010	ne
1. teden - 2. teden	0.225	ne
1. teden - 4. teden	0.301	ne
4. teden - 3. teden	0.099	ne
4. teden - 2. teden	0.855	ne
2. teden - 3. teden	0.138	ne
Modificirana stopnja zaupanja:	0.005	

Tabela 15: Analiza razlik v času maksimuma prevoja citokroma c različno starih muh z intervalom zaupanja 95 % s pomočjo Bonferronijeve korekcije.

primerjava časov	p	značilno različno
4. teden - 0. teden	0.000	da
4. teden - 1. teden	0.032	ne
4. teden - 3. teden	0.123	ne
4. teden - 2. teden	0.350	ne
2. teden - 0. teden	0.043	ne
2. teden - 1. teden	0.367	ne
2. teden - 3. teden	0.745	ne
3. teden - 0. teden	0.034	ne
3. teden - 1. teden	0.475	ne
1. teden - 0. teden	0.186	ne
Modificirana stopnja zaupanja	0.005	

Tabela 16: Analiza razlik v amplitudi maksimuma prevoja citokroma c različno starih muh z intervalom zaupanja 95 % s pomočjo Bonferronijeve korekcije.

primerjava amplitud	p	značilno različno
4. teden - 0. teden	< 0,0001	da
4. teden - 1. teden	0.006	ne
4. teden - 2. teden	0.502	ne
4. teden - 3. teden	0.738	ne
3. teden - 0. teden	< 0,0001	da
3. teden - 1. teden	0.016	ne
3. teden - 2. teden	0.693	ne
2. teden - 0. teden	< 0,0001	da
2. teden - 1. teden	0.091	ne
1. teden - 0. teden	< 0,0001	da
Modificirana stopnja zaupanja	0.005	

Tabela 17: Analiza razlik v času minimuma prevoja citokroma c različno starih muh z intervalom zaupanja 95 % s pomočjo Bonferronijeve korekcije:

primerjava časov	p	značilno različno
4. teden - 0. teden	0.001	da
4. teden - 2. teden	0.005	da
4. teden - 3. teden	0.009	ne
4. teden - 1. teden	0.018	ne
1. teden - 0. teden	0.282	ne
1. teden - 2. teden	0.494	ne
1. teden - 3. teden	0.938	ne
3. teden - 0. teden	0.274	ne
3. teden - 2. teden	0.510	ne
2. teden - 0. teden	0.779	ne
Modificirana stopnja zaupanja	0.005	

Tabela 18: Analiza razlik v amplitudi minimuma prevoja citokroma c različno starih muh z intervalom zaupanja 95 % s pomočjo Bonferronijeve korekcije.

primerjava amplitud	p	značilno različno
2. teden - 0. teden	0.002	da
2. teden - 1. teden	0.422	ne
2. teden - 3. teden	0.654	ne
2. teden - 4. teden	0.765	ne
4. teden - 0. teden	0.000	da
4. teden - 1. teden	0.514	ne
4. teden - 3. teden	0.846	ne
3. teden - 0. teden	0.001	da
3. teden - 1. teden	0.633	ne
1. teden - 0. teden	0.007	ne
Modificirana stopnja zaupanja	0.005	

Tabela 19: Analiza razlik v amplitudi odgovora citokroma c po 10 s osvetlitve različno starih muh z intervalom zaupanja 95 % s pomočjo Bonferronijeve korekcije.

primerjava amplitud	p	značilno različno
4. teden - 0. teden	< 0,0001	da
4. teden - 1. teden	0.118	ne
4. teden - 3. teden	0.222	ne
4. teden - 2. teden	0.512	ne
2. teden - 0. teden	0.000	da
2. teden - 1. teden	0.355	ne
2. teden - 3. teden	0.567	ne
3. teden - 0. teden	0.001	da
3. teden - 1. teden	0.722	ne
1. teden - 0. teden	0.003	da
Modificirana stopnja zaupanja	0.005	

Tabela 20: Analiza razlik v amplitudi odgovora citokroma a po 10 s osvetlitve različno starih muh z intervalom zaupanja 95 % s pomočjo Bonferronijeve korekcije.

primerjava amplitud	p	značilno različno
1. teden - 2. teden	< 0,0001	da
1. teden - 4. teden	< 0,0001	da
1. teden - 0. teden	0.033	ne
1. teden - 3. teden	0.999	ne
3. teden - 2. teden	< 0,0001	da
3. teden - 4. teden	< 0,0001	da
3. teden - 0. teden	0.033	ne
0. teden - 2. teden	< 0,0001	da
0. teden - 4. teden	< 0,0001	da
4. teden - 2. teden	0.998	ne
Modificirana stopnja zaupanja	0.005	

Tabela 21: Analiza razlik v času tranzienta citokroma a₃ različno starih muh z intervalom zaupanja 95 % s pomočjo Bonferronijeve korekcije.

primerjava amplitud	p	značilno različno
1. teden - 2. teden	0.004	da
1. teden - 4. teden	0.000	da
1. teden - 0. teden	< 0,0001	da
1. teden - 3. teden	0.009	ne
3. teden - 2. teden	0.774	ne
3. teden - 4. teden	0.280	ne
3. teden - 0. teden	< 0,0001	da
0. teden - 2. teden	< 0,0001	da
0. teden - 4. teden	< 0,0001	da
4. teden - 2. teden	0.425	ne
Modificirana stopnja zaupanja	0.005	

Tabela 22: Analiza razlik v amplitudi tranzienta citokroma a_3 različno starih muh z intervalom zaupanja 95 % s pomočjo Bonferronijeve korekcije.

primerjava amplitud	p	značilno različno
0. teden - 4. teden	< 0,0001	da
0. teden - 3. teden	< 0,0001	da
0. teden - 2. teden	< 0,0001	da
0. teden - 1. teden	< 0,0001	da
1. teden - 4. teden	< 0,0001	da
1. teden - 3. teden	< 0,0001	da
1. teden - 2. teden	0.000	da
2. teden - 4. teden	0.003	da
2. teden - 3. teden	0.205	ne
3. teden - 4. teden	0.087	ne
Modificirana stopnja zaupanja:	0.005	

Tabela 23: Analiza razlik v amplitudi odgovora citokroma a_3 po 10 s osvetlitve različno starih muh z intervalom zaupanja 95 % s pomočjo Bonferronijeve korekcije.

primerjava amplitud	p	značilno različno
0. teden - 3. teden	< 0,0001	da
0. teden - 4. teden	< 0,0001	da
0. teden - 2. teden	< 0,0001	da
0. teden - 1. teden	< 0,0001	da
1. teden - 3. teden	0.000	da
1. teden - 4. teden	0.001	da
1. teden - 2. teden	0.012	ne
2. teden - 3. teden	0.191	ne
2. teden - 4. teden	0.319	ne
4. teden - 3. teden	0.731	ne
Modificirana stopnja zaupanja:	0.005	