

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Jerneja RUDOLF

**S STARANJEM POVEZANE FUNKCIONALNE
SPREMEMBE OKSIDATIVNEGA METABOLIZMA V
OČESU VINSKE MUŠICE
(*Drosophila melanogaster*)**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Jerneja RUDOLF (PAVLETIČ)

**S STARANJEM POVEZANE FUNKCIONALNE SPREMEMBE
OKSIDATIVNEGA METABOLIZMA V OČESU VINSKE MUŠICE
(*Drosophila melanogaster*)**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**AGING RELATED FUNCTIONAL CHANGES OF OXIDATIVE
METHABOLISM IN *Drosophila melanogaster* EYE**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za nevrobiologijo, fiziologijo in etologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorja je bil imenovan doc. dr. Gregor Zupančič.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Rok KOSTANJŠEK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: 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

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.

Datum zagovora: 10. 09. 2009

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Jerneja Rudolf

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	591.18:595.77(043.2)=163.6
KG	Drosophila/dihalni pigmenti/citokromi/staranje/oksidativni metabolizem
AV	RUDOLF, Jerneja
SA	ZUPANČIČ, Gregor
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2009
IN	S staranjem povezane funkcionalne spremembe oksidativnega metabolizma v očesu vinske mušice (<i>Drosophila melanogaster</i>)
TD	Diplomsko delo
OP	IX, 35 str., 16 sl., 30 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Za delovanje fotoreceptorskih celic in za vzdrževanje ionskih gradientov preko plazemske membrane je potrebna znatna količina metabolne energije, ki jo zagotavlja predvsem oksidativni metabolizem v mitohondrijih. Pri poskusih na muhah (<i>Calliphora vicina</i>) je bilo ugotovljeno, da se po izleganju iz bube metabolni aparat še vedno razvija. Zlasti očitno je povečanje koncentracije dihalnih pigmentov v očesu v prvem tednu po izleganju. Namen naloge je bil odkriti, ali je dozorevanje celičnega dihalnega aparata v očesu podobno tudi pri vinskih mušicah (<i>Drosophila melanogaster</i>), ki so standardni objekt za študije fototransdukcije pri žuželkah. Za spremljanje funkcionalnih lastnosti dihalnih pigmentov smo uporabili metodo dinamičnih spektrofotometričnih meritev sprememb spektralne absorpcije. Izmerjene diferenčne spektre smo analizirali s pomočjo spektralne dekonvolucije in uporabe metode poglobitvenih komponent. Pri različno starih živalih smo ocenili relativno razliko v koncentraciji dihalnih pigmentov, tako da smo izmerili velikost razlik med redoks stanji hemov a, a₃, b in c med normalno in čisto dušikovo atmosfero. Ugotovili smo da se tudi pri vinskih mušicah koncentracija dihalnih pigmentov po izleganju povečuje, a v mnogo manjšem obsegu in počasneje kot pri muhah. Razlike so po našem mnenju posledica razlik v življenjskem slogu obeh vrst. Za muhe vrste <i>C. vicina</i> je namreč značilna visoka mirovna poraba, ki zagotavlja večjo informacijsko učinkovitost kodiranja vidne informacije potrebno za njihov (hitro leteč) življenjski slog.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC 591.18:595.77(043.2)=163.6

CX *Drosophila*/respiratory pigments/cytochromes/aging/oxidative metabolism

AU RUDOLF, Jerneja

AA ZUPANČIČ, Gregor

PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Biology

PY 2009

TI Aging related changes of oxidative metabolism in *Drosophila melanogaster* eye

DT Graduation thesis

NO IX, 35 p., 16 fig., 30 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Functioning of photoreceptor cells and maintenance of ion gradients across the plasma membrane requires a notable amount of metabolic energy, which is supplied by mitochondrial oxidative metabolism. Experiments on blowflies (*Calliphora vicina*) have shown that the metabolic apparatus is evolving even post eclosion. Especially in the first week after eclosion there is a sizeable increase in the concentration of respiratory pigments in the eye. The goal of this work was to determine whether the eye of a fruitfly (*Drosophila melanogaster*) undergoes a similar maturation of the respiratory apparatus, since it is the standard object for the study of the process of phototransduction in insects. We used dynamic spectrophotometric measurements of changes in spectral absorption in order to determine the functional changes of respiratory pigments. The recorded differential spectra were analyzed using spectral deconvolution and principal components analysis. We estimated the relative change in the concentration of respiratory pigments in animals of different ages by measuring the differences in the redox states of hemes a, a₃, b and c in normal and pure nitrogen atmosphere. Our results do indicate an increase in the concentration of respiratory pigments after eclosion, however the changes are smaller and slower from those observed in *C. vicina*. In our opinion the reason for these differences is a different life style of the two species. The blowflies have a bigger steady-state energy consumption, which allows higher efficiency of visual information coding needed for their (fast flying) life style.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	III
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK.....	VII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VIII
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 DELOVNA HIPOTEZA.....	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 MITOHONDRIJ IN CELIČNO DIHANJE.....	2
2.1.1 Zgradba mitohondrija	2
2.1.2 Celično dihanje	3
2.1.3 Kompleksi dihalne verige.....	4
2.1.3.1 Kompleks I (NADH dehidrogenaza).....	4
2.1.3.2 Kompleks II (sukcinat dehidrogenaza)	5
2.1.3.3 Kompleks III (citokrom c reduktaza)	5
2.1.3.4 Kompleks IV (citokrom c oksidaza)	7
2.1.3.5 Kompleks V (ATP sintaza)	8
2.2 OKO VINSKE MUŠICE IN FOTOTRANSDUKCIJA	10
2.2.1 Zgradba očesa vinske mušice	10
2.2.2 Vidni pigment	12
2.2.3 Fototransdukcija	12
2.3 ENERGIJSKE POTREBE FOTORECEPTORJEV	14
2.4 DOZOREVANJE CELIČNEGA DIHALNEGA APARATA PRI MUHAH	15
3 MATERIALI IN METODE	16
3.1 POSKUSNE ŽIVALI	16
3.2 PREPARACIJA	16
3.3 SPREMINJANJE PLINSKE SESTAVE V POSKUSNI KAMRICI.....	16
3.4 OSVETLJEVANJE	17

3.5	BELEŽENJE ODGOVORA.....	19
3.6	POSKUSNI PROTOKOL.....	19
3.7	OBDELAVA PODATKOV	20
4	REZULTATI.....	21
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	26
6	POVZETEK	31
7	VIRI.....	33

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematičen prikaz zgradbe mitohondrija.....	2
Slika 2: Dihalna veriga.....	4
Slika 3: Shema Q cikla.....	6
Slika 4: Kompleks IV (citokrom c oksidaza).....	8
Slika 5: Zgradba ATP sintaze.....	9
Slika 6: Shema sestavljenega očesa.....	11
Slika 7: Shema fototransdukcijske verige v mikrovilu.....	13
Slika 8: Shema sistema za vzpostavitev hipoksije..	17
Slika 9: Shema sistema za osvetljevanje.....	18
Slika 10: Časovni potek odziva dihalnih pigmentov na anoksijo.....	22
Slika 11: Razlike v amplitudi in hitrosti odziva med citokromi.....	23
Slika 12: Spreminjanje koncentracije reducirane oblike citokromov s starostjo.....	24
Slika 13: Normirana hitrost odziva citokromov na anoksijo pri različno starih živalih.....	25
Slika 14: Primerjava rezultatov pri vinskih mušicah in muhah.....	28
Slika 15: Surovi in diferenčni spekter hemov v dušiku pri <i>D. melanogaster</i>	30
Slika 16: Surovi in diferenčni spekter hemov v dušiku pri <i>C. vicina</i>	31

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

$A_{(s)}$	spektralna absorpcija
ARR2	arestin 2
AcCoA	acetil koencim A
ADP, ATP	adenozindifosfat, adenzintrifosfat
Ca^{2+}	kalcijev ion
CaM	kalmodulin
Cl^{-}	klorov ion
CO_2	ogljikov dioksid
DAG	diaglicerol
e^{-}	elektron
ϵ	molarni ekstinkcijski koeficient
FAD, $FADH_2$	flavin adenin dinukleotid, dihidroksi flavin adenin dinukleotid
Fe-S	železo-žveplovi centri
FMN	flavin mononukleotid
G_q	heterodimerna G-beljakovina tipa q
GDP, GTP	gvanozindifosfat, gvanozintrifosfat
H^{+}	vodikov proton
$h\nu$	svetloba
IP_3	inozitoltrifosfat
K^{+}	kalijev ion
λ	valovna dolžina svetlobe
MgO	magnezijev oksid
N_2	molekularni dušik
Na^{2+}	natrijev ion

$3\text{Na}^{2+}/2\text{K}^{+}$ ATPaza	natrij-kalijeva črpalka, ki z vsakim razcepom ATP prečrpa 3 Na^{+} ione iz celice in 2 K^{+} iona v celico
$\text{NAD}^{+}/\text{NADH}$	nikotinamid adenin dinukleotid (oksidirana in reducirana oblika)
O_2	molekularni kisik
P_i	fosfat
$\text{PI}, \text{PIP}, \text{PIP}_2$	inozitolfosfat, fosfatidilinozitolfosfat, fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat
PKC	proteinkinaza C
$\text{PLC}\beta$	fosfolipaza $\text{C}\beta$
P_{O_2}	delni tlak kisika
PUFA	ang.: 'polysaturated fatty acids' - nenasičene maščobne kisline
R1-R8	fotoreceptorske celice
SMC	submikrovilarne cisterne
TRP, TRPL	ang.: 'transient receptor potential, transient receptor potential like' kationski kanalček prehodnega receptorskega potenciala in kanalček podoben TRP
UQ, UQH, UQH_2	ubikinon, semikinonski radikal, ubikinol
w^{-}	mutanta <i>D. melanogaster</i> brez zaščitnega pigmenta
w^{-t}	divji tip <i>D. melanogaster</i>

1 UVOD

1.1 NAMEN DELA

Z uporabo dinamične diferenčne refleksne spektroskopije smo želeli preučiti s starostjo pogojene spremembe v odzivu dihalne verige na fiziološko obremenitev (anoksijo) očesa vinske mušice. Pri poskusih z muhami (*Calliphora vicina*) je bilo ugotovljeno, da se po izleganju odrasle muhe metabolni aparat še vedno razvija, kar zelo verjetno močno vpliva tudi na delovanje procesa fototransdukcije (Jenko, 2007, Meglič, 2009). Vendar pa je standardni objekt za študij tako fototransdukcije pri žuželkah kot tudi procesov razvoja in staranja vinska mušica (*Drosophila melanogaster*). Zato je bil namen tega dela ugotoviti, kaj se z metabolnim aparatom in njegovim delovanjem dogaja pri vinskih mušicah.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Pričakujemo, da se celični dihalni aparat tudi pri vinski mušici po izleganju odrasle živali še spreminja. Največje spremembe pričakujemo v prvem tednu po izleganju.

2 PREGLED OBJAV

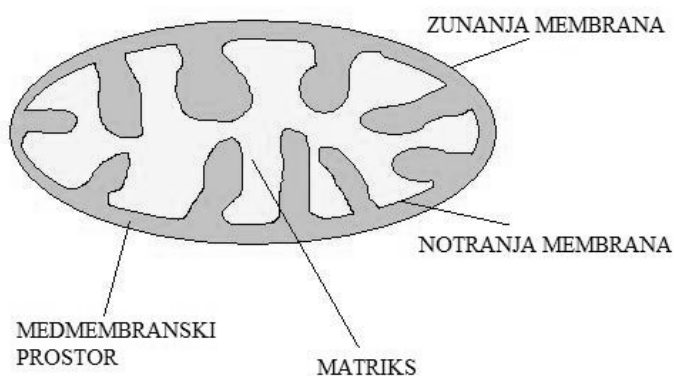
2.1 MITOHONDRIJ IN CELIČNO DIHANJE

2.1.1 Zgradba mitohondrija

Mitohondrij je celični organel, sestavljen iz matriksa, ki ga obdajata notranja in zunanja membrana, med njima pa se nahaja medmembranski prostor. Zunanjo membrano mitohondrija sestavlja veliko število transportnih beljakovin porinov, zaradi katerih je prepustna za vse molekule manjše od 5 kD vključno z manjšimi beljakovinami. Na njej se nahajajo tudi encimi potrebni za sintezo lipidov in encimi, ki pretvorijo lipidne substrate v obliko, ki se nato metabolizira v matriksu.

Notranja membrana je nagubana in tvori gube različnih oblik – kriste. Struktura notranje mitohondrijske membrane je kompleksna, saj so vanjo vgrajeni številni ionski kanalčki in druge beljakovine. Na kristah notranje mitohondrijske membrane so tudi kompleksi elektronske transportne verige in ATP sintaza. Ker so v notranjo membrano vpeti encimi dihalne verige, je gostota krist v mitohondrijih odvisna od respiratorne aktivnosti celic.

Oblika mitohondrijev in njihova mobilnost sta različni v različnih tipih celic, včasih celo znotraj ene celice. Različna je lahko tudi morfologija (oblika krist) mitohondrijev, ki je (med drugim) odvisna od koncentracije ADP v okolici mitohondrija. (Detmer in Chan, 2007)

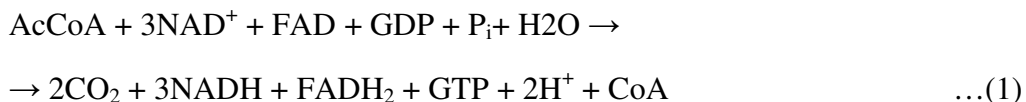


Slika 1: Shematičen prikaz zgradbe mitohondrija. Notranja membrana je nagubana v kriste.

2.1.2 Celično dihanje

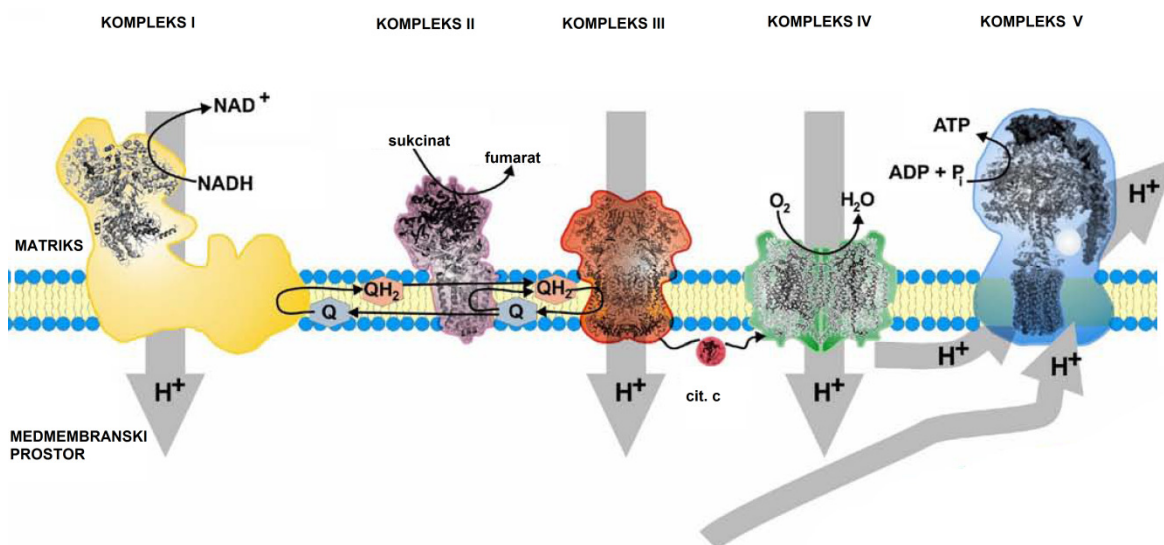
Celično dihanje ali oksidativna fosforilacija je proces oksidacije organskih snovi, v katerem se sprošča energija. Kemično gledano gre za zaporedje oksidacij in redukcij. Sladkorji se najprej oksidirajo v procesu glikolize, ki poteka v citosolu celice. Produkt glikolize, piruvat, se transportira v matriks mitohondrija, kjer v procesu oksidativne dekarboksilacije tvori aktivirano očetno kislino, znano kot acetil koencim A (AcCoA). Pri katabolizmu nekaterih aminokislin prav tako nastajata piruvat ali AcCoA. Tudi končni produkt β -maščobne oksidacije (oksidacije maščobnih kislin) v matriksu mitohondrija je AcCoA. Ta vstopa v drugi sklop metabolnih procesov – Krebsov cikel (cikel citronske kisline). Cikel sestavlja serija oksido-redukcijskih reakcij, pri katerih se acetilna skupina oksidira v dve molekuli CO_2 . V Krebsovem ciklu se elektroni iz ogljikovih spojin prenesejo na molekule NAD^+ in FAD.

Stehiometrija Krebsovega cikla je:



Elektroni se iz NADH, FADH_2 v elektronski transportni verigi preko vrste prenašalcev prenesejo do končnega akceptorja – kisika in ga reducirajo. Dihalna veriga je sestavljena iz več kompleksov: NADH-dehidrogenaze (kompleks I), sukcinat-dehidrogenaze (kompleks II), citokrom c reduktaze (kompleks III) in citokrom c oksidaze (kompleks IV); dveh mobilnih prenašalcev: ubikinona (med kompleksoma I in II ter kompleksom III) in citokroma c (med kompleksoma III in IV) ter ATP sintaze (kompleks V). Energija, ki se sprošča med prehajanjem elektronov z enega prenašalca v dihalni verigi na drugega, se porabi večinoma za črpanje protonov v prostor med notranjo in zunanjo mitohondrijsko membrano. Vsak proton, ki se iz matriksa mitohondrija prenese v medmembranski prostor, prispeva k protonskemu elektrokemijskemu gradientu prek notranje mitohondrijske membrane, ki ga ATP sintaza uporabi za tvorbo ATP.

2.1.3 Kompleksi dihalne verige

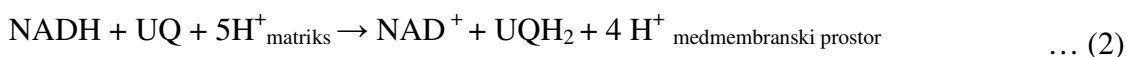


Slika 2: Dihalna veriga. Elektroni vstopajo v verigo na kompleksih I in II. S pomočjo mobilnih elektronskih prenašalcev ubikinona (Q) in citokroma c (cit. c) se nato prenesejo prek kompleksa III na kompleks IV, kjer je končni elektronski akceptor molekularni kisik. Kompleksi I, III in IV s črpanjem protonov ustvarjajo tudi protonski elektrokemični gradient, ki poganja ATP sintazo (kompleks V). (prirejeno po Seelert in sod., 2009)

2.1.3.1 Kompleks I (NADH dehidrogenaza)

Kompleks I ima obliko črke L, katere daljši del predstavlja hidrofobna integralna membranska beljakovina, krajši hidrofilni del pa vsebuje FMN in NADH aktivni center. Evkariontska NADH dehidrogenaza je sestavljena iz več kot 35 podenot in je eden najbolj zapletenih znanih membranskih beljakovinskih kompleksov. (Freidrich in Scheide 2000)

Kompleks katalizira reakcijo:



Encim veže NADH, dva elektrona se prenese na FMN prostetično skupino kompleksa in jo tako reducirata v FMNH₂. Elektroni se nato prenesejo na železo-žveplove (Fe-S) centre

v encimu in nazadnje na ubikinon¹, ki ga reducirajo v ubikinol. Kompleks I je tudi protonska črpalka, saj se ob prenosu dveh elektronov iz NADH₂ v medmembranski prostor prečrpajo štirje protoni. (Yano, 2002)

2.1.3.2 Kompleks II (sukcinat dehidrogenaza)

Sukcinat dehidrogenaza je hkrati encim Krebsovega cikla in del elektronske transportne verige. Sestavljena je iz štirih beljakovinskih podenot, od katerih sta dve (SdhC in SdhD) usidrani v membrano. Flavoprotein (SdhA) in železo-žveplova podenota (SchB) tvorita dehidrogenazni del kompleksa, ki sega v matriks mitohondrija. (Ackrell, 2002)

Kompleks II katalizira nastanek FADH₂ z oksidacijo sukcinata v fumarat v Krebsovem ciklu. Iz FADH₂ molekul, ki kompleksa ne zapustijo, se elektroni prenesejo na tri Fe-S centre v SchB podenoti in nato na ubikinon¹. V nasprotju s kompleksom I, kompleks II ne prenaša protonov, zato pri oksidaciji FADH₂ tvori manj molekul ATP kot pri oksidaciji NADH. (Hägerhäll, 1997)

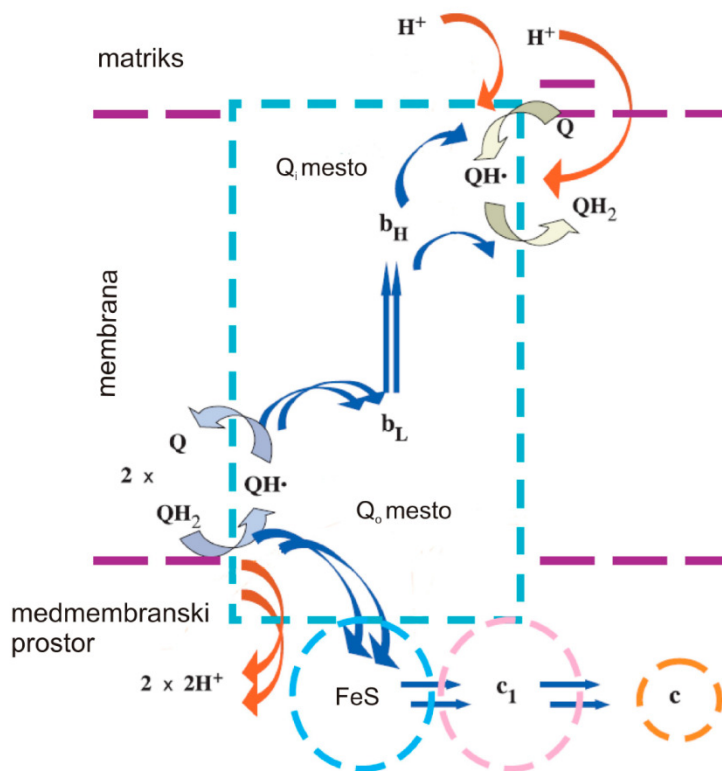
2.1.3.3 Kompleks III (citokrom c reduktaza)

Citokromi so hemproteini, kar pomeni da vsebujejo hem kot prostetično skupino. Struktura hema (organski obroč okoli kovinskega, navadno železovega iona) omogoča mobilnost elektronov. Tako je z oksidacijo in redukcijo citokromov mogoč transport elektronov.

Evkariontska citokrom c reduktaza je homodimerni membranski kompleks. Vsaka monomera vsebuje tri katalitične podenote: citokrom b, citokrom c in Rieskejev protein z

¹ Ubikinon 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 (UQH[•]), ali dva elektrona, kjer nastane ubikinol (UQH₂). Ubikinon tako deluje kot povezovalac med dwoelektronskimi donorji in enoelektronskimi akceptorji. Ubikinol prenese elektrone od kompleksa I in II do kompleksa III.

Fe-S centrom. Citokrom c sestavlja hem tipa c_1 , citokrom b pa dva hema: b_L in b_H . Poleg omenjenih podenot, se v vsaki monomeri nahaja še vsaj 8 dodatnih podenot. (Link in sod., 1986)



Slika 3: Shema Q cikla. Z modrimi puščicami je nakazana pot elektronov, z oranžnimi pa protonov. Dve vzporedni puščici predstavljata dva elektrona, ki ju posamično odda ubikinol. Prehod: ubikinon – semiubikinon – ubikinol predstavljajo debelejšje puščice. (prirejeno po Crofts, 2004)

V kompleksu III potekata sklopljeno transport elektronov iz ubikinola na citokrom c in transmembranski transport protonov, kar skupno imenujemo Q cikel. V tem ciklu so prek dveh elektronskih transportnih verig povezana tri katalitična mesta. Prvo je mesto Q_0 , kjer poteka oksidacija ubikinola, tako da se en elektron veže na Rieskejev center, drugi pa na hem b_L . Prvi elektron se (s premikom Rieskejevega centra) prenese naprej iz Fe-S centra na hem c_1 , nato pa dalje na citokrom c, ki z difuzijo zapusti kompleks. Drugi elektron se iz hema b_L prenese na hem b_H in konča pot na mestu Q_i , kjer s sprejemom enega elektrona kinon oksidira v semiubikinon. Šele ob oksidaciji naslednje molekule ubikinola

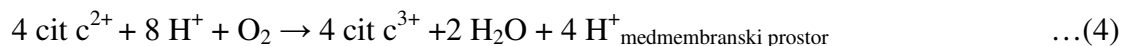
semiubikininon na Q_i mestu oksidira v ubikininon, ki oddifundira iz sistema. Pri vsakem opisanem ciklu se na mestu Q_i privzameta dva protona iz matriksa, na mestu Q_o pa dva protona oddata v medmembranski prostor. (Crofts 2004)

Celokupna reakcija je torej sledeča:

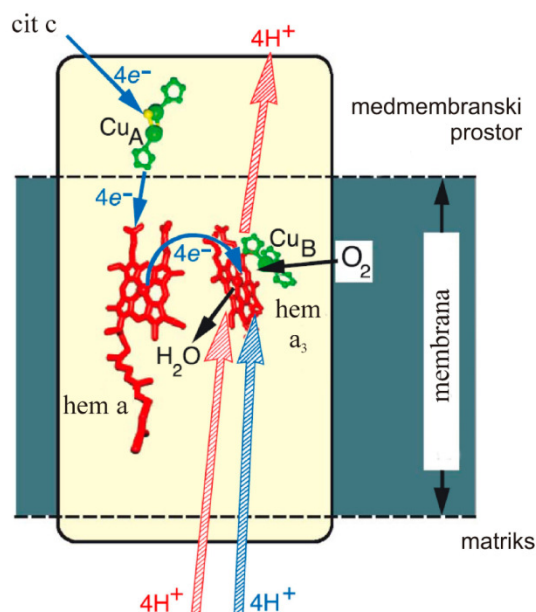


2.1.3.4 Kompleks IV (citokrom c oksidaza)

Citokrom c oksidaza je zadnji člen elektronske transportne verige in katalizira redukcijo kisika, pri čemer nastane molekula vode. Ob reakciji poteče tudi prenos 4 protonov iz matriksa v medmembranski prostor:



Kompleks je iz trinajstih podenot, tri so kodirane z mitohondrijskim genomom. Vsebuje dva tipa hema a: a in a_3 ter tri bakrove ione, razporejene v dve podenoti. Donor elektronov je citokrom c, ki prenese en elektron po medmembranskem prostoru in ga preko bakrovega centra Cu_A odda hemu a. Ob tem se na še neznanem mestu privzame en proton iz matriksa. Elektron potuje dalje na hem a_3 - Cu_B mesto. S tem je povezana sprostitvev protona v medmembranski prostor, čemur sledi prevzem novega protona iz matriksa na hem a_3 - Cu_B mestu, kjer pride do nastanka vode. (Wickström, 2004)



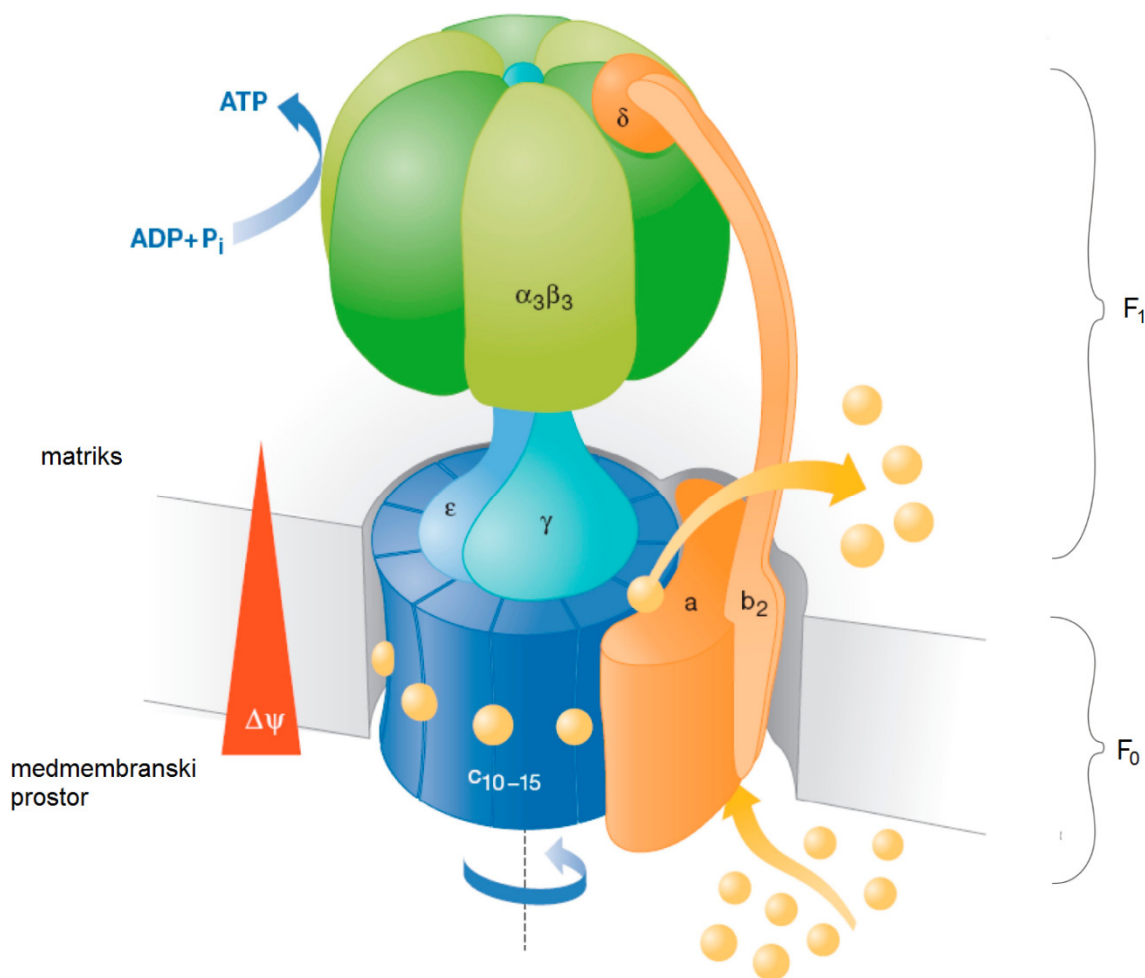
Slika 4: Kompleks IV (citokrom c oksidaza). Na kompleksu potekata sklopljeno črpanje protonov prek membrane in prenos elektronov na končni akceptor kisik. Modre puščice označujejo reakcijo redukcije kisika, pri kateri nastane voda. Rdeče puščice označujejo črpanje protonov prek membrane. (Prirejeno po Wickström, 2004)

2.1.3.5 Kompleks V (ATP sintaza)

Mitohondrijska ATP sintaza je ATP-aza tipa F in je sestavljena iz dveh različnih enot: v membrano usidrane enote F_0 in periferne membranske enote F_1 . Katalitična domena F_1 vsebuje podenote označene z α , β , γ , δ in ϵ , in sicer v razmerju 3 : 3 : 1 : 1 : 1. F_0 del pa sestavljajo: ena podenota a , dve podenoti b in več podenot c (10-15).

Podenote α in β so združene v kompleks $\alpha_3\beta_3$, kjer poteka sinteza ATP, podenote c pa v cilindričen kompleks, ki skupaj z podenoto a deluje kot motor ATP sintaze. Podenote γ , δ in ϵ tvorijo notranji povezovalni del, ki povezuje $\alpha_3\beta_3$ kompleks enote F_1 z enoto F_0 .

Položaj podenot dodatno utrjuje še povezava med δ in b . (Slika 5)



Slika 5: Zgradba ATP sintaze. ATP sintaza je sestavljena iz dveh enot: F_1 (s podenotami $\alpha_3\beta_3$, γ , δ in ϵ) in F_0 (s podenotami a , b_2 in c_{10-15}). Tok protonov, ki ga nakazuje oranžna puščica, omogoča, rotacijo podenot c_{10-15} , γ in ϵ , ki so na sliki predstavljene v modri barvi. (prirejeno po Dimroth in sod., 2006)

Pri sintezi ATP je ključnega pomena rotacija določenih delov ATP sintaze. Na stiku podenote a in rotorja (cilindričnega oligomera iz podenot c) prehajajo protoni čez notranjo membrano, tako da enote c rotirajo, ko oddajajo protone. Smer rotacije je odvisna od protonskega gradienta. Skupaj s podenotami c rotira tudi podenota γ , kar povzroči konformacijske spremembe, ki vodijo v produkcijo ATP na $\alpha_3\beta_3$. (Dimroth in sod., 2006)

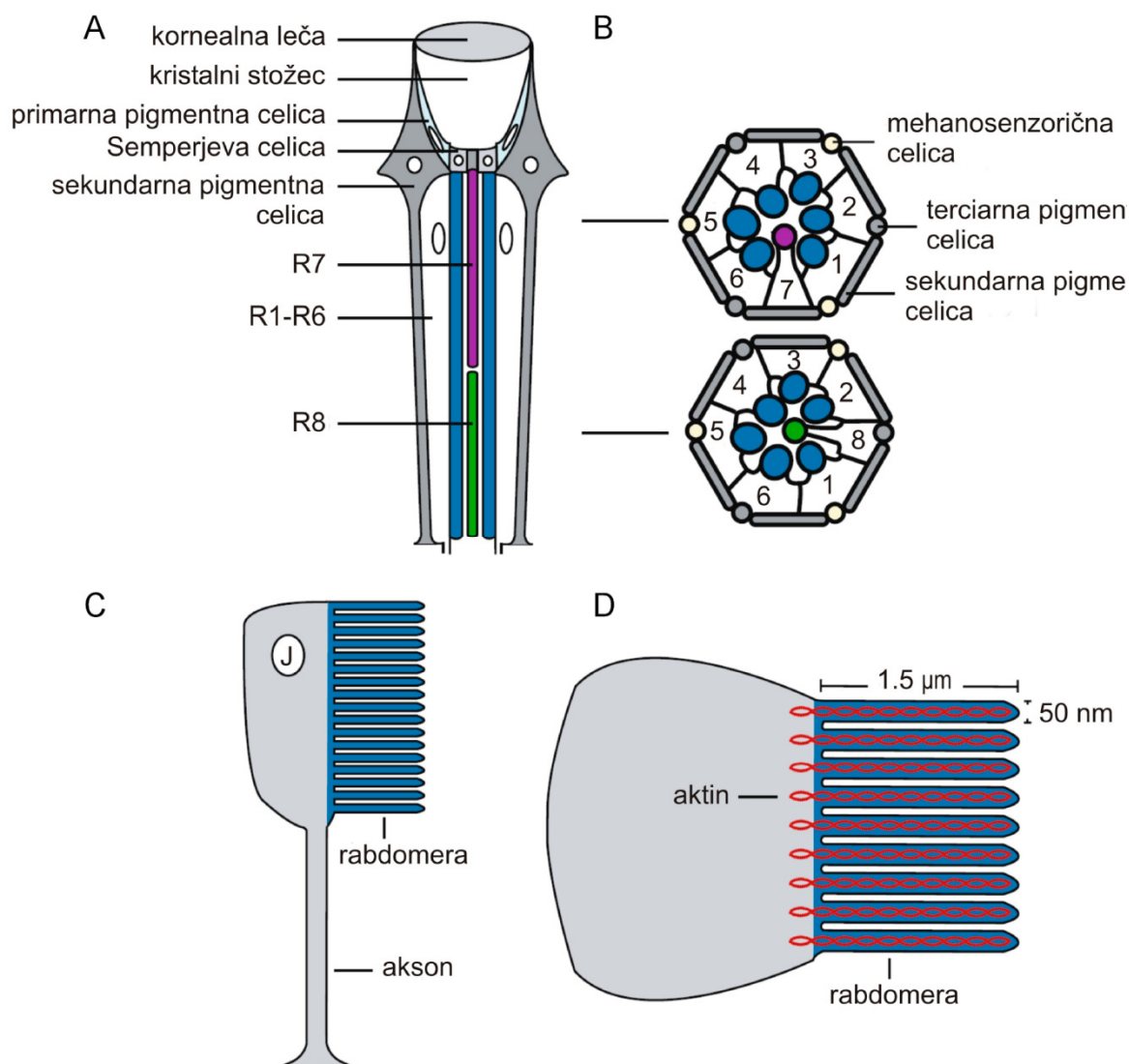
2.2 OKO VINSKE MUŠICE IN FOTOTRANSDUKCIJA

2.2.1 Zgradba očesa vinske mušice

Fasetno oko žuželk je sestavljeno iz očesc ali omatidijev. Oko dvokrilcev (Diptera) imenujemo nevralno superpozicijsko, kar pomeni, da svetloba ne prehaja med omatidiji in se informacije iz sosednjih omatidijev združujejo šele na nivoju nevronov v optičnih ganglijih (Hardie, 1986; Horridge, 1987). Oko vinske mušice sestavlja približno 800 omatidijev; premer vsakega je približno 35 μm . Vsak omatidij je sestavljen iz 20 celic, od tega 8 fotoreceptorskih oz. retinula celic. Funkcionalno je omatidij razdeljen na dioptrični in fotosenzitivni aparat.

Dioptrični aparat prevaja svetlobo do fotoreceptorjev. Sestavljata ga roženična leča in kristalni stožec, ki je zunajcelični izloček štirih Semperjevih celic. Obe strukturi usmerjata svetlobo proti retinula celicam. Pot in količino svetlobe uravnavajo primarne, sekundarne in terciarne pigmentne celice. Primarni pigmentni celici obdajata kristalni stožec, absorbirata svetlobo v pigmentnih zrnih in s tem omejujeta količino svetlobe, ki vstopi v receptorske celice. Šest sekundarnih in šest terciarnih pigmentnih celic, ki obdajajo celotno očesce in odstavke do bazalne lamine, preprečuje prehod svetlobe med omatidiji in jih s tem optično ločuje. Pri belookih mutantih pigmentnih zrn ni in zato sosednji omatidiji niso optično ločeni.

Fotoreceptorski del omatidija predstavlja osem retinula celic, ki jih označujemo z R1-R8. Njihovi čutilni deli skupaj tvorijo odprt rabdom, v katerega vsaka od čutilnih celic prispeva svojo rabdomero. Rabdomero celice predstavlja membrana (obrnjena v notranjost rabdoma) nagubana v 30 000-50 000 (velja za R1-R6) 1- 2 μm dolgih in 50-60 nm širokih mikrovilov. Membrana mikrovilov vsebuje vidni pigment rodopsin in druge elemente fototransdukcijske kaskade.



Slika 6: Shema sestavljenega očesa. A - Zgradba omatidija *D. melanogaster*. **B** - Prečni prerez omatidija distalno in proksimalno. **C** – Vzdolžni prerez fotoreceptorske celice. N označuje jedro celice. **D** – Prečni prerez fotoreceptorske celice z označeno velikostjo mikrovilov (velja za R1-R6 celice). (prirejeno po Wang in Montell, 2007)

Receptorske celice R1-R6 potekajo vzdolž celotne dolžine rabdoma, rabdomeri celic R7 in R8 pa sta krajši in ležita ena nad drugo. Celice R1-R6 zaznavajo svetlobo monokromatsko (funkcionalno ustrezajo vretenčarskim palčkam), celici R7 in R8 pa omogočata barvno gledanje (funkcionalno ustrezata vretenčarskim čepkom). Rabdomera R7 leži distalno in je najbolj občutljiva za ultravijolično svetlobo, proksimalna rabdomera R8 pa je najbolj občutljiva za modrozeleno svetlobo. (Wang in Montell, 2007, Katz in Minke, 2009)

Na bazi mikrovilov se v celicah nahaja sistem submikrovilarnih cistern (SMC), ki je del gladkega endoplazmatskega retikuluma in med drugi predstavlja znotrajcelično zalogo Ca^{2+} . Kisik, potreben za delovanje receptorskih celic, priteka po traheolah, ki izraščajo iz velikih zračnih vreč v glavi. Vsak omatidij oskrbuje ena traheola. (Hamdorf in sod., 1988)

2.2.2 Vidni pigment

Vidni pigment rodopsin je ključen za pretvorbo svetlobne energije v električni odziv fotoreceptorske celice. V enem mikrovilu je več kot 1000 molekul vidnega pigmenta. Molekula rodopsina je zgrajena iz dveh delov. Beljakovinski del molekule – opsin je sestavljen iz sedmih transmembranskih segmentov in je prek Schiffove baze kovalentno povezan z nebeljakovinsko kromoforo – 3-hidroksi-retinalom.

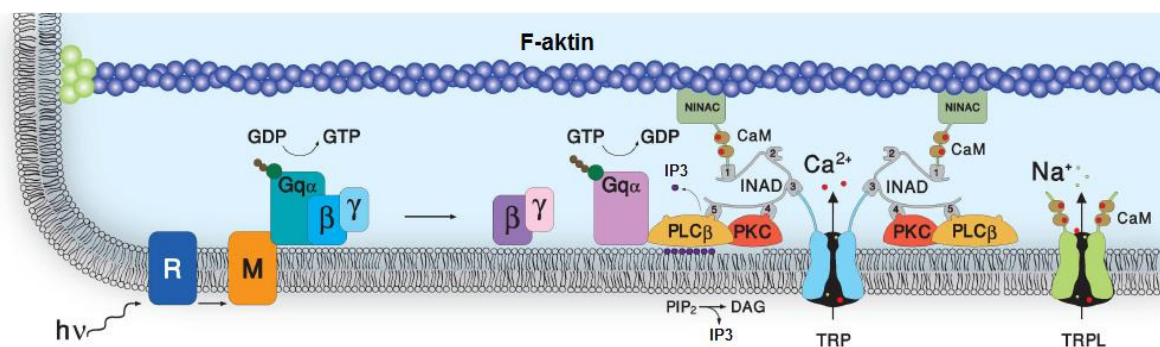
Absorpcija fotona svetlobe ustrezne valovne dolžine povzroči konformacijsko spremembo rodopsina iz 11-cis v all-trans obliko. Po kratkotrajnih termolabilnih stanjih nastane stabilna molekula metarodopsin. Z absorpcijo dolgovalovne svetlobe se metarodopsin ponovno izomerizira v rodopsin. Termostabilni stanji rodopsina in metarodopsina imata različni spektralni občutljivosti. Rodopsin celic R1-R6 ima pri vinski mušici absorpcijski vrh v modrozelenem delu spektra ($\lambda=480$ nm), metarodopsin pa v rdečem delu spektra ($\lambda=570$ nm). (Stavenga, 1995)

2.2.3 Fototransdukcija

Fototransdukcija je proces pretvorbe svetlobne energije v električni odziv receptorja, ki poteka na membrani mikrovilov. Kot že rečeno se ta proces začne s spremembo rodopsina v metarodopsin. Nadalje poteka fototransdukcija kot tipična G-beljakovinska veriga. Aktivni metarodopsin katalizira zamenjavo gvanozindifosfata (GDP), vezanega na α podenoto G_q -beljakovine (G_q), z gvanozintrifosfatom (GTP). $G_q\alpha$ podenota se odcepi od $G_q\beta\gamma$ dimera in se veže na fosfolipazo C- β (PLC- β). PLC nato cepi fosfatidilinozitol-4,5-

bifosfat (PIP₂) na topni inozitoltrifosfat (IP₃) in membransko vezani diacilglicerol (DAG). Z razgradnjo DAG nastanejo večkrat nenasičene maščobne kisline (PUFA).

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 Ca²⁺ kot Na⁺ ione, TRPL pa je bolj neselektiven kationski kanalček. Dokazano je, da je aktivacija TRP in TRPL kanalčkov posledica razpada PIP₂, ter da pri tem IP₃ ne igra vloge. Ni pa še jasno ali do nje pride zaradi zmanjšane koncentracije PIP₂ v membrani ali zaradi povišane koncentracije DAG ali morda PUFA. Za slednje je bilo recimo že dokazano, da lahko povzročijo odprtje TRP kanalčkov (Chyb in sod. 1999).



Slika 7: Shema fototransdukcijske verige v mikrovilu. Foton svetlobe spremeni rodopsin (R) v metarodopsin (M), kar sproži razpad G_q. G_qα se veže na PLC-β, ki cepi PIP₂ na topni IP₃ in membransko vezani DAG. Končni učinek je aktivacija TRP in TRPL kanalčkov. Vidimo tudi povezavo TRP, PLC in PKC z beljakovino INAD, ki je prek kalmodulina (CaM) in beljakovine NINAC vezana na F-aktin pod mikrovilarno membrano. (prirejeno po Seelret in sod., 2009)

Beljakovina INAD povezuje TRP kanalčke, PLCβ in beljakovinsko kinazo. Celoten kompleks je preko kalmodulina in beljakovine NINAC (oblike miozina) pripet na aktinske filamente pod mikrovilarno membrano. (Slika 7)

Inaktivacija verige poteka s pomočjo arrestina 2 (ARR2), ki se veže na metarodopsin in ga s tem inaktivira. ARR2 ostane vezan na metarodopsinu, dokler se ta pod vplivom rdeče svetlobe ne pretvori nazaj v rodopsin. IP₃ difundira do submikrovilarnih cistern (SMC), kjer se začne njegova pretvorba nazaj v PIP₂. (Katz in Minke, 2009)

2.3 ENERGIJSKE POTREBE FOTORECEPTORJEV

Vse celice potrebujejo energijo za svoje delovanje. Osnovna oblika energije, ki jo uporabljajo, je kemijska energija vsebovana v fosfatnih vezeh molekule ATP. Ta energija se sprošča ob reakciji razcepa ATP molekule na ADP in fosfat, ki jo katalizirajo različne ATPaze. Različna tkiva in tipi celic se razlikujejo glede na energijske zahteve. Več študij je pokazalo, da so živčevje in z njim povezane strukture, zlasti čutilni sistemi, energijsko zelo zahtevni, čeprav večinoma predstavljajo relativno majhen delež telesne mase. Pri muhah (*Calliphora vicina*), je bilo na primer dokazano, da retina porablja kar 8% energije potrebne za vzdrževanje bazalnega metabolizma (BMR = basal metabolic rate, Howard in sod. 1987). V splošnem velja, da z zapletenostjo in/ali velikostjo receptorskega sistema naraščajo njegove energijske zahteve. A kompleksnejši receptorski sistem navadno pomeni tudi učinkovitejše zaznavanje in procesiranje informacij. Tako lahko sklepamo, da so čutilni sistemi skozi evolucijo neprestano podvrženi dvema nasprotujočima si selekcijskima pritiskoma: težnji po manjši energijski porabi in težnji po večji informacijski učinkovitosti. (Niven, Laughlin 2008)

Osredotočimo se na energijske potrebe fotoreceptorjev pri žuželkah. Že v mirovanju fotoreceptorja, torej ob odsotnosti svetlobnih dražljajev, morajo celice zadostiti nekaterim energijskim zahtevam. Poleg izgradnje makromolekul in drugih celičnih procesov, trošijo receptorske celice energijo tudi za vzdrževanje koncentracijskega gradienta ionov, sintezo nevrottransmitorjev, tvorbo in transport sinaptičnih veziklov ipd..

Za informacijsko učinkovitost fotoreceptorske celice je ključna visoka prevodnost njene membrane. Večja prevodnost namreč pomeni manjšo časovno konstanto membrane receptorske celice, kar omogoča boljšo časovno ločljivost pri procesiranju in posredovanju informacij. Ker pa večja prevodnost membrane v praksi pomeni puščanje membranskih kanalčkov tudi v mirovanju fotoreceptorske celice, mora celica vlagati več energije v vzdrževanje mirovnega membranskega potenciala. To nalogo v veliki meri opravlja $3\text{Na}^+/2\text{K}^+$ ATPaza, ki z vsakim razcepom ATP prečrpa 3 Na^+ ione iz celice in 2 K^+ iona v celico. Na delovanje $3\text{Na}^+/2\text{K}^+$ ATPaze je vezano še veliko drugih ionskih simportov in antiportov, med drugim transport Ca^{2+} , Cl^- in HCO_3^- ionov. Od delovanja $3\text{Na}^+/2\text{K}^+$

ATPaze so torej odvisni elektrokemijski in koncentracijski gradienti različnih ionov, kar nadalje vpliva tudi na transport preko ionskih kanalčkov. Študije energijske porabe fotoreceptorjev pri muhah (*Calliphora vicina*) kažejo, da so glavni ponor energije v fotoreceptorjih prav premiki ionov čez električno vzdrazne membrane. (Laughlin in sod., 1998, Pangeršič in sod., 2005)

Vidimo, da so fotoreceptorji živali, kakršne so muhe, ki morajo zaradi letečega načina življenja izredno hitro obdelovati svetlobno informacijo, že v mirovanju energijsko precej zahtevni. Ob svetlobnem dražljaju se sproži še proces fototransdukcije in proženje receptorskih potencialov, kar terja dodatno energijo. Odprtje kanalčkov TRP in TRPL, povzroči veliko povečanje proste koncentracije Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiporter (CalX) ob vstopu 3 Na^+ ionov v celico, iz celice prečrpa en Ca^{2+} ion. Tako se v celici zmanjšuje $[\text{Ca}^{2+}]$, a povečuje $[\text{Na}^+]$ (Wu in sod., 2009). Za črpanje Na^+ iz celice pa je, kot že rečeno, odgovorna $3\text{Na}^+/\text{2K}^+$ ATPaza. Ob draženju/osvetlitvi lahko torej pričakujemo še večjo porabo energije s strani $3\text{Na}^+/\text{2K}^+$ ATPaze. Niven in sodelavci (2007) so primerjali energijsko porabo fotoreceptorjev različnih vrst dvokrilcev (Diptera) v mirovanju in maksimalno energijsko porabo (ob osvetlitvi). Rezultati kažejo povezavo med energijsko porabo v mirovanju in ob osvetlitvi pri posamezni vrsti. Poraba v mirovanju ustreza okoli 25% maksimalne porabe energije fotoreceptorja.

2.4 DOZOREVANJE CELIČNEGA DIHALNEGA APARATA PRI MUHAH

Poskusi na muhah (*Caliphora vicina*) so pokazali, da se metabolni aparat po izleganju odrasle živali iz bube še vedno razvija. Med drugim se s starostjo spreminjata količina dihalnih pigmentov in nekoliko tudi oblika odziva na obremenitev. Največje spremembe so v prvem tednu po izleganju odrasle živali, ko se koncentracija citokromov poveča za okoli 60%. Pri starejših muhah (4 tedne) je bil opažen rahel a statistično neznačilen upad koncentracije citokromov (Jenko, 2007, Meglič, 2009).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POSKUSNE ŽIVALI

Poskusne živali so bile belooke mutante (w^-) vinskih mušic (*Drosophila melanogaster*) brez ostalih mutacij (divji fenotip w^-). Gojili smo jih na dnevno-nočnem ciklu 12/12 (12 ur na svetlobi, 12 ur v temi).

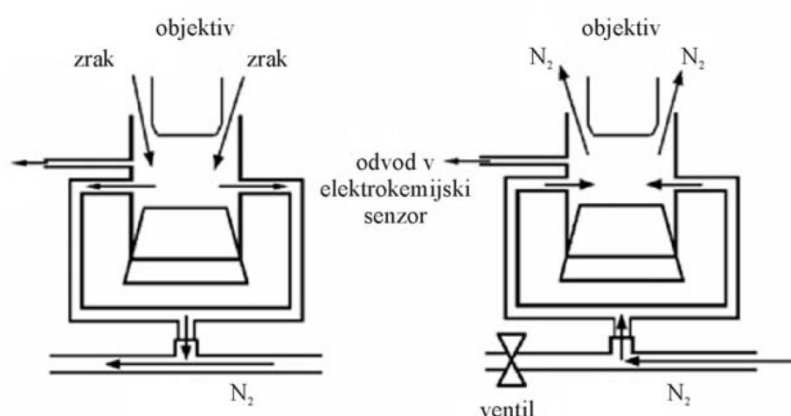
3.2 PREPARACIJA

Preparacijo smo opravili s pomočjo stereomikroskopa s stransko osvetlitvijo z rdečo svetlobo, ki je favorizirala pretvorbo metarodopsina v rodopsin, s čimer smo zmanjšali neželeno draženje očesa. Poskusne živali smo pritrdili na poseben kovinski podstavek: zgoraj raven in na spodnji strani oblikovan kot kroglast ležaj. Za imobilizacijo živali smo uporabili zmes dveh delov kolofonije in enega dela voska (Krönigova mešanica), s katero smo na podstavek pritrdili najprej krila, nato noge in glavo, fiksirali lizalo in antene. Pri tem smo pazili, da so odprtine trahej ostale proste. Abdomen smo pustili prost. Naš podstavek je bil kot ležaj vstavljen v podstavek iz polimerizirane epoksidne smole (SPURR), kar je omogočilo gibljivost in s tem optimalno postavitev. 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, da smo zmanjšali neželeno draženje očesa pred poskusom.

3.3 SPREMINJANJE PLINSKE SESTAVE V POSKUSNI KAMRICI

Kamrico s podstavkom in muho smo namestili pod objektiv mikroskopa in nanjo namestili tri cevke, dve za dovajanje atmosferskega zraka oz. za dovajanje dušika in eno za odvod plinske mešanice v elektrokemijski senzor P_{O_2} (ECHO, Slovenija). Z elektrokemijskim

senzorjem P_{O_2} smo nadzirali pravilno delovanje sistema za dovajanje dušika. Dušik smo dovajali preko mešalnega merilca pretoka (Cole-Parmer, ZDA), ki je bil povezan z jeklenko z dušikom. Anoksijo smo vzpostavili s pomočjo trismernega 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 38 ml/s. Ventil smo s krmilili s pomočjo protokola, ki je bil napisan v programu Spike (CED, Velika Britanija).

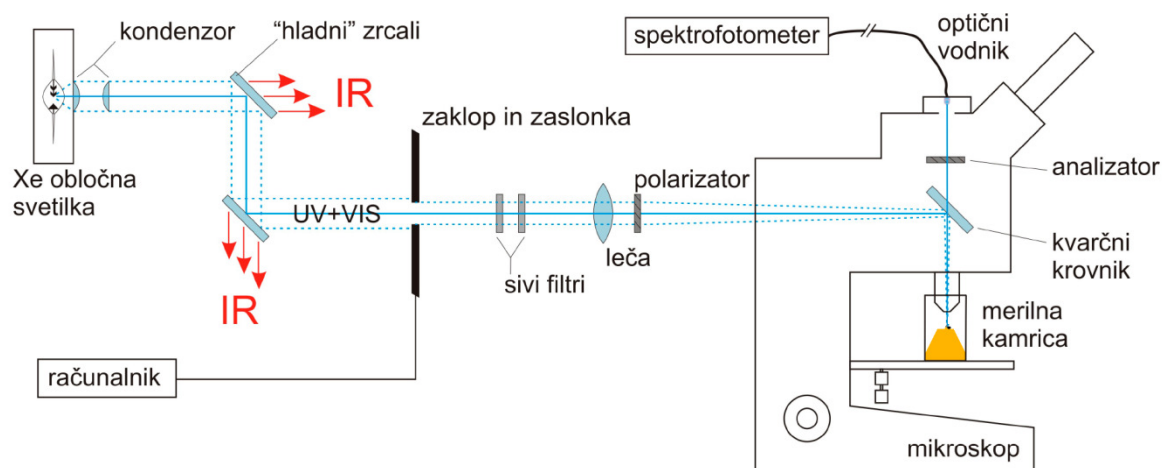


Slika 8: Shema sistema za vzpostavitev hipoksije. Ko je bil ventil odprt, je kamrico naplavljal atmosferski zrak, ob zaprtju ventila pa N_2 .

3.4 OSVETLJEVANJE

Oko smo med poskusom osvetljevali z belo svetlobo. Kot vir svetlobe smo uporabili ksenonsko obločno žarnico z močjo 150 W (Osram, Nemčija) v ohišju s kvarčnim kondenzorjem in senzorjem za relativno jakost svetlobnega fluksa (Newport, ZDA). Senzor je to informacijo posredoval elektronskemu regulatorju (Newport, ZDA), ki je kompenziral nihanja svetlobnega fluksa z dinamičnim prilagajanjem toka skozi obločno

žarnico. 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 premočno 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 siv filter (Carl Zeiss, Nemčija) za uravnavanje jakosti svetlobe. Za filtri smo v času nameščanja preparata namestili še rdeči filter, ki smo ga pred poskusom odstranili. Sledila je kvarčna leča z goriščno razdaljo 1 m, ki je skupaj z objektivom zbirala svetlobo v ravnini preparata. Svetloba je bila nato usmerjena v modificiran refleksni mikroskop (Leitz-Orthoplan, Nemčija), ki je omogočal osvetlitev preparata z belo svetlobo skozi objektiv. To nam je omogočal kvarčni krovnik, postavljen pod kotom 45° , ki je deloval kot »polprepustno« zrcalo, ki je manjši del svetlobe odbilo, večji pa prepustilo, pri čemer pa ni spremenilo barvne sestave svetlobe. Za poskuse smo uporabili objektiv Neofluar s 16-kratno povečavo in numerično aperturo 0.4 (Zeiss, Nemčija). Z vertikalnim premikanjem mikroskopske mizice smo svetlobo zbrali na mušjem očesu. (Slika 9)



Slika 9: Shema sistema za osvetljevanje. Svetlobo iz Xe žarnice smo usmerili skozi dvojni periskopski filter, da smo se znebili IR dela spektra. Leča, kvarčni krovnik in objektiv so zbirali svetlobo na ravnini preparata. S kombinacijo polarizirane svetlobe in analizatorja smo zmanjšali odboje s površine očesa. Mikroskop je bil z optičnim vodnikom povezan s spektrofotometrom. (prirejeno po Meglič, 2009)

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. Svetloba odbita z gladkih površin namreč v veliki meri ohrani os polarizacije vpadle svetlobe, medtem, ko svetloba iz globine preparata, kjer pride do večkratnih odbojev pod mnogimi koti izgubi svojo os polarizacije. 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.

3.6 POSKUSNI PROTOKOL

Poskusni protokol je trajal 260 s. Po osvetlitvi je bila kamrica 20 s napolnjena z zrakom, nato smo za 2 minuti zaprli ventil in tako napolnili kamrico z dušikom, sledili pa sta še dve minuti, ko je bil v kamrici zopet zrak. Za izračun vrednosti refleksije in absorpcije smo za vsak poskus 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 preučevanem območju. MgO ima tudi to prednost, da odbita svetloba na enak način kot pri preparatu, izgubi svojo glavno os polarizacije zaradi večkratnih odbojev na mejah posameznih kristalov.

3.7 OBDELAVA PODATKOV

Spektre smo obdelali v programu Matlab (Math Works, ZDA). Iz surovih spektrov poskusnega objekta in referenčnih spektrov smo izračunali najprej reflektanco (delež odbite svetlobe, glede na standard – MgO), iz te absorbcijo in končno diferenčne absorpcijske spektre ($\Delta A_{n(s)}$). Nato smo z različnimi matematičnimi postopki povečali razmerje signal/šum. Iz (filtrirane) časovno-spektralne matrike smo izračunali prispevek posameznih dihalnih pigmentov. Pri tem smo kot referenčne spektre (za reducirane in oksidirane oblike) citokromov uporabili spektre molarnih ekstinkcijskih koeficientov iz literature. Tako smo dobili matrike časovnih potekov sprememb redoks stanj citokromov. Lambertov zakon določa razmerje med absorbcijo in koncentracijo kot:

$$A_{n(s)} = \varepsilon_{diff(s)} c l \quad \dots(5)$$

($A_{n(s)}$ je absorpcija zaporedne meritve n pri valovni dolžini s , $\varepsilon_{diff(s)}$ molarni ekstinkcijski koeficient pri valovni dolžini s , c koncentracija in l dolžina optične poti.) Natančne dolžine optične poti ne poznamo (zaradi odbojev v omatidijih), zato smo spremembo koncentracije reducirane oblike zapisali kot produkt spremembe koncentracije in dolžine optične poti ($\Delta c l$) z enoto μMcm .

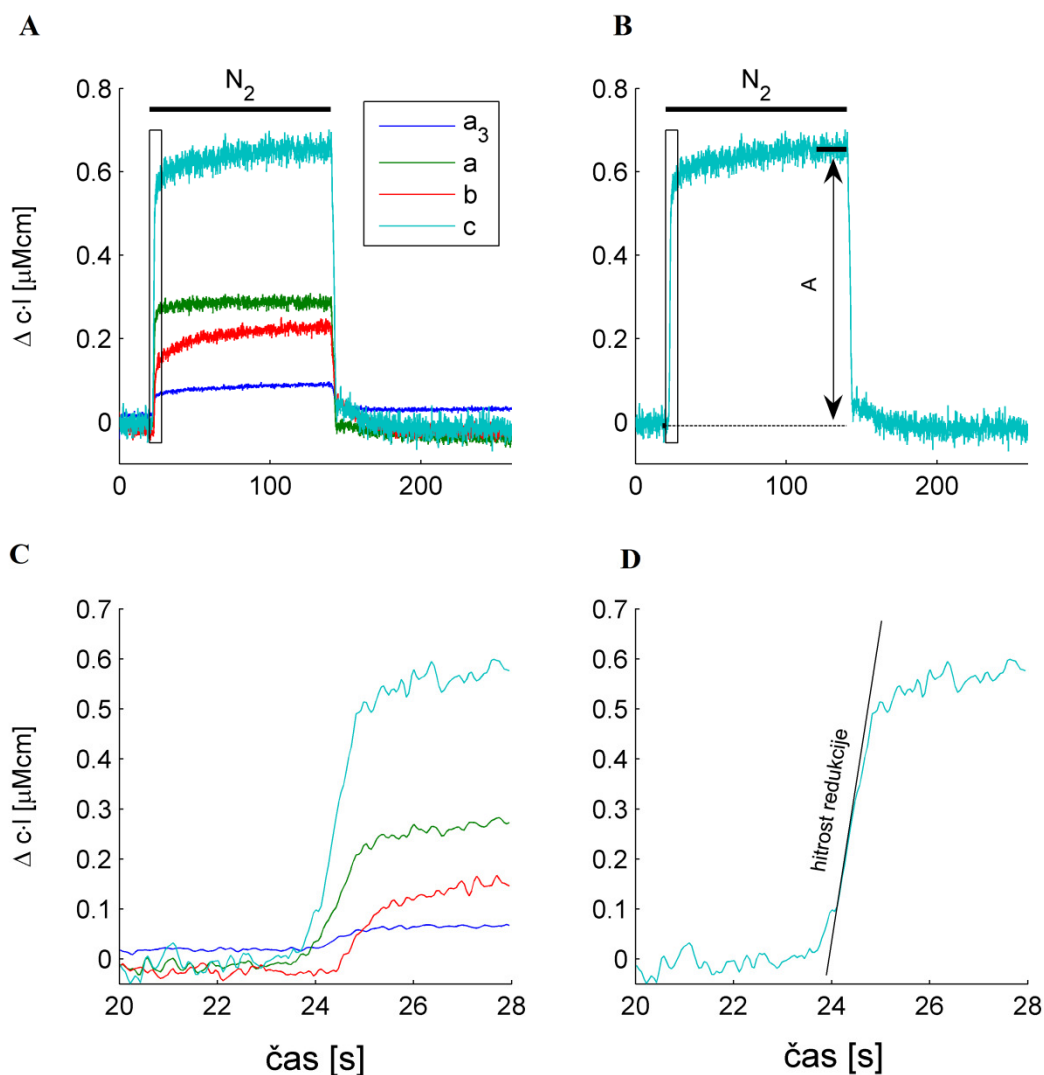
Postopek je podrobneje opisal Zupančič (2003).

4 REZULTATI

V normalnih atmosferskih pogojih za vse citokrome velja, da se vedno določen delež molekul nahaja v reduciranem stanju, preostanek pa v oksidiranem. Delež reduciranih molekul nekega dihalnega pigmenta lahko imenujemo tudi stopnja redukcije in je za različne citokrome različen. Če pa vzpostavimo anoksične pogoje (kot pri naših poskusih), celicam sčasoma zmanjka kisika, ki bi deloval kot končni akceptor elektronov. Tako lahko pričakujemo, da se v anoksičnih pogojih vsi dihalni pigmenti sčasoma popolnoma reducirajo.

Ker se absorpcijske lastnosti citokromov spreminjajo glede na njihovo redoks stanje, lahko njihovo relativno stopnjo redukcije spremljamo z dinamično refleksno spektroskopijo. Ob vzpostavitvi anoksije je amplituda maksimalnega odgovora posameznega dihalnega pigmenta odvisna od koncentracije dihalnega pigmenta v očesu, pa tudi od stopnje redukcije v atmosferskih pogojih. Zato iz amplitude maksimalnega odziva dihalnih pigmentov ne moremo izračunati absolutnih koncentracij pigmentov in jih primerjati med sabo. Lahko pa primerjamo amplitude odzivov za isti pigment pri živalih različne starosti. S tem lahko sledimo spreminjanju koncentracije določenega dihalnega pigmenta s starostjo. Z dinamično refleksno spektroskopijo izmerjena amplituda odziva citokroma na anoksijo je torej lahko relativna mera za koncentracijo, ne pa absolutna.

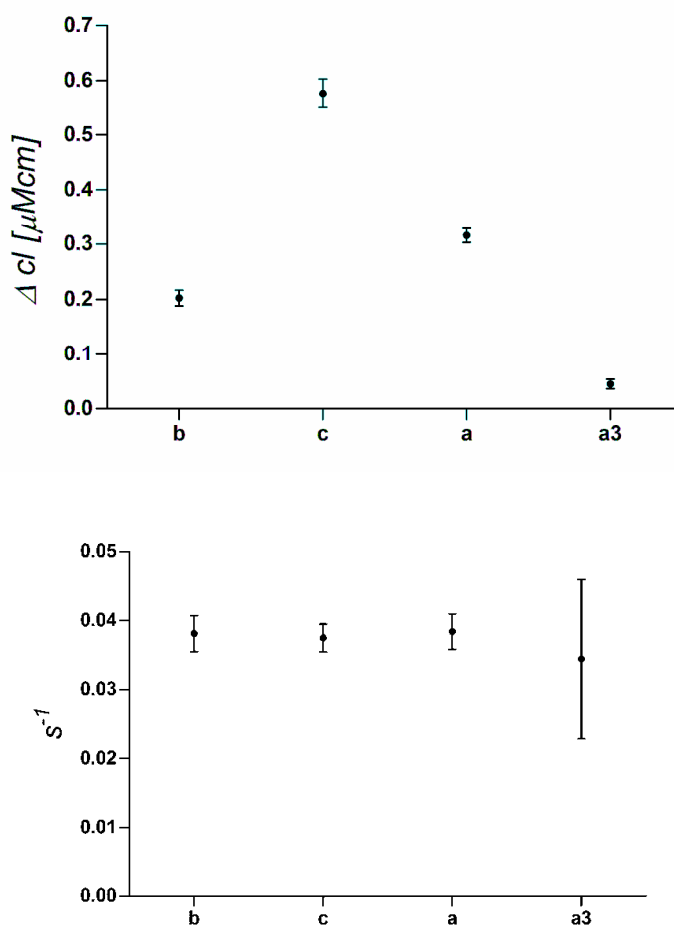
Na sliki (Slika 10) je predstavljen časovni potek dogajanja v poskusnem protokolu. Rezultati so predstavljeni kot sprememba koncentracije reducirane oblike dihalnega pigmenta pomnožena z dolžino optične poti, od tod enote μMcm . Za vsak preučevani dihalni pigment smo določili tudi normirano hitrost odziva, ki se je pri sorodnih poskusih z različnimi mutantami vinskih mušic izkazala kot pomemben parameter (Čehovin, 2004). Maksimalno hitrost spremembe redoks stanja ob prehodu v anoksične pogoje smo delili z maksimalno amplitudo in tako dobili normirano hitrost (ang. »rate«) odziva z enoto s^{-1} .



Slika 10: Časovni potek odziva dihalnih pigmentov na anoksijo. **A** - Celoten časovni potek poskusa za vse citokrome. Z N_2 je označenih 120 s, ko je bila žival v dušiku. **B** – Potek poskusa za citokrom c . Z A je označena amplituda maksimalnega odgovora na anoksijo. (Izračunali smo jo kot razliko med povprečjem odgovora med 18. in 20. s (tik pred vzpostavitvijo anoksije) in povprečjem odgovora med 120. in 140. s (zadnjih 20 s v N_2).) S pravokotnikom označeni del na grafih A in B je predstavljen na grafih C in D. **C** – Odziv citokromov na anoksijo med 20. in 28. sekundo poskusa. **D** - Največja hitrost odziva citokroma c na anoksijo. Ko smo delili naklon narisane premice z maksimalno amplitudo odziva, smo dobili normirano hitrost odziva v enotah s^{-1} . (sliko izdelal Zupančič G.)

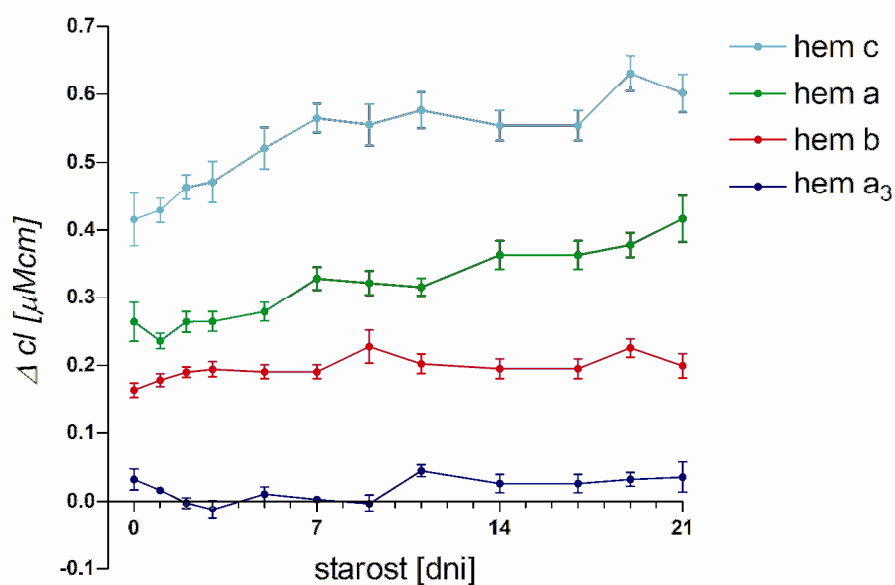
Maksimalni odzivi različnih dihalnih pigmentov so med seboj različni. Po amplitudi maksimalnega odziva si po vrsti od največje proti najmanjši sledijo: hem c, hem a, hem b, hem a₃. Ne smemo pozabiti, da razlike v amplitudah med različnimi hemi ne pomenijo proporcionalnih razlik v koncentracijah teh hemov. Razlike so predstavljene zgolj zaradi lažjega razumevanja in interpretacije podatkov.

Tudi največja hitrost odziva na anoksijo (naklon krivulje) je pri različnih pigmentih različna. To je zaradi razlik v amplitudah odziva pričakovano. Če hitrost delimo z amplitudo maksimalnega odziva, dobimo normirano hitrost odziva. Ta pa za heme c,b in a pri večini starosti ni statistično značilno različna. Za starost vinskih mušic 11 dni, so razlike med odzivom različnih dihalnih pigmentov predstavljene na sliki (Slika 11).



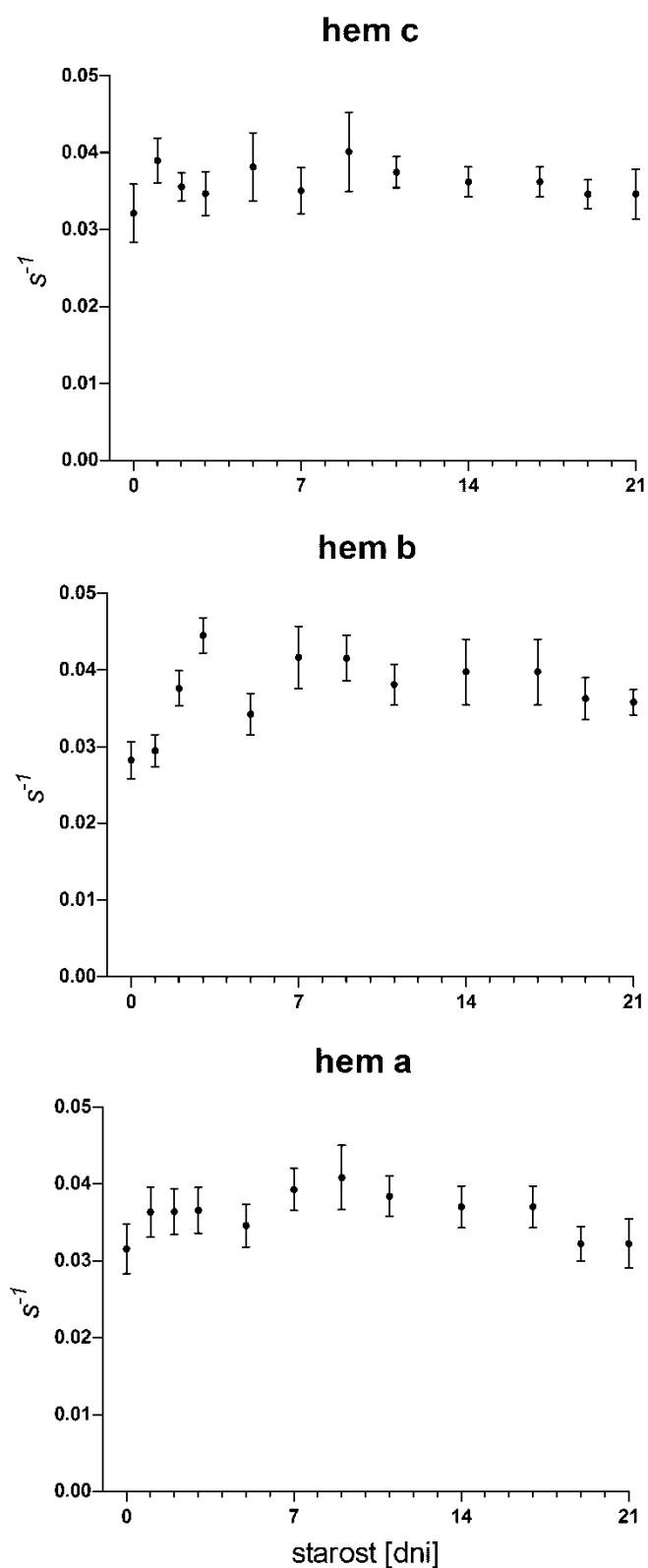
Slika 11: Razlike v amplitudi in hitrosti odziva med citokromi. Zgoraj: Amplituda maksimalnega odziva citokromov na anoksijo. **Spodaj:** Normirana hitrost odziva citokromov na anoksijo. (starost živali 11 dni, N=12)

Opisani protokol smo uporabili na vinskih mušicah različne starosti. Amplituda maksimalnega odziva dihalne verige na anoksijo se pri hemih c in a očitno povečuje s starostjo. Zato lahko sklepamo, da se koncentracija teh dveh hemov povečuje v prvih treh tednih od izleganja odrasle vinske mušice. (Zaradi postopnega povečevanja koncentracije ne moremo vedeti, ali je koncentracija v tretjem tednu že tudi maksimalna, ki jo dihalni pigmenti dosežejo.) Pri hemu b so razlike med različnimi starostmi manjše in naraščanje koncentracije ni statistično značilno. Iz naših rezultatov bi presenetljivo lahko sklepali, da se, hem a_3 v anoksičnih pogojih včasih reducira, včasih pa oksidira, glede na stanje v atmosferskih pogojih. Sprememba koncentracije reducirane oblike je za a_3 namreč pri nekaterih poskusih negativna, od tod tudi negativne povprečne vrednosti pri nekaterih starostih. (Slika 12, Priloga 1)



Slika 12: Spreminjanje koncentracije reducirane oblike citokromov s starostjo. Pri hemih a(zelena) in c(svetlo modra) je očitno naraščanje koncentracije reducirane oblike. Pri hemu b(rdeča) ni statistično značilnih sprememb koncentracije. Koncentracija reducirane oblike a_3 je včasih negativna, kar pomeni oksidacijo hema v anoksiji. Vse mušice smo gojili na 12/12 ciklu. (N za posamezno starost je med 6 in 12)

Normirana hitrost odziva na anoksijo je med živalmi iste starosti lahko zelo različna. Za hem b, c in a ni statistično značilnih razlik v povprečni hitrosti odziva pri različnih starostih. Podatki za hitrost odziva pri hemu a_3 niso informativni, saj je pri vsakem poskusu, ki kaže oksidacijo hema, hitrost negativna. (Slika 13, Priloga 2)



Slika 13: Normirana hitrost odziva citokromov na anoksijo pri različno starih živalih. Za heme b, c in a ni statistično značilnih razlik v hitrosti odziva na anoksijo pri različnih starostih živali. ($6 < N < 12$)

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Namen naše naloge je bil preučiti s starostjo pogojene spremembe v odzivu dihalne verige na fiziološko obremenitev (anoksijo) očesa vinske mušice. Za spremljanje funkcionalnih lastnosti dihalnih pigmentov smo uporabili metodo dinamičnih spektrofotometričnih meritev sprememb spektralne absorpcije. Pri različno starih živalih smo ocenili relativno razliko v koncentraciji dihalnih pigmentov, tako da smo izmerili velikost razlik med redoks stanji hemov a, a₃, b in c med normalno in čisto dušikovo atmosfero.

Tovrstne meritve na muhah (*Calliphora vicina*) so pokazale, da se po izleganju odrasle muhe metabolni aparat še vedno razvija, kar zelo verjetno močno vpliva tudi na delovanje procesa fototransdukcije. Med drugim se s starostjo spreminjata količina dihalnih pigmentov in nekoliko tudi oblika odziva na obremenitev. Največje spremembe so v prvem tednu po izleganju odrasle živali, ko se koncentracija citokromov poveča za okoli 60%. Pri starejših muhah (4 tedne) je bil opažen rahel a statistično neznačilen upad koncentracije citokromov (Jenko, 2007, Meglič, 2009).

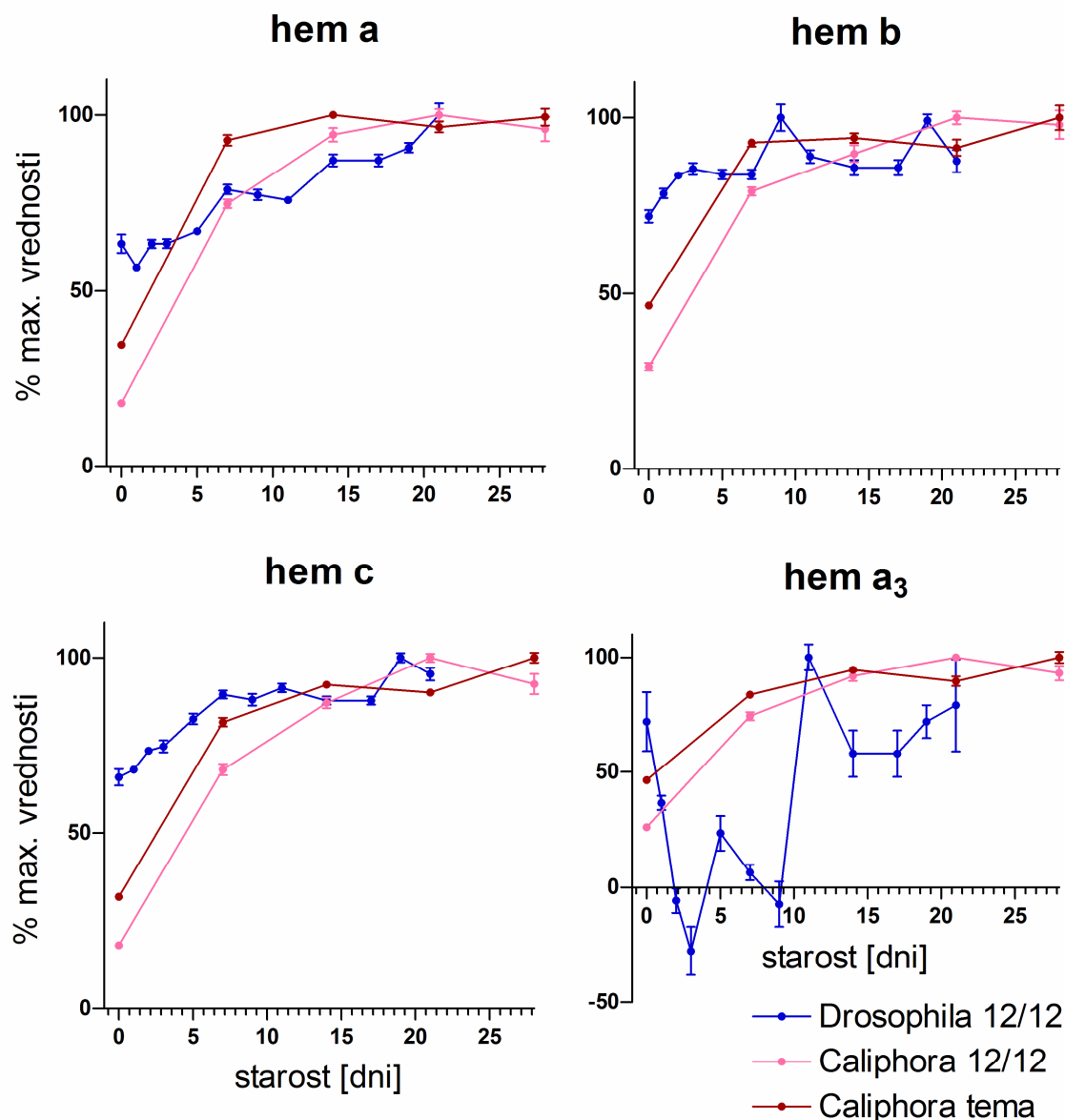
Različne študije metabolizma in energijske porabe dajejo nasprotujoče si rezultate o spreminjanju celičnega dihalnega aparata in delovanja mitohondrijev s starostjo. Meritve stopnje metabolizma celih živali za vrsto *Drosophila simulans* na primer kažejo naraščanje metabolne aktivnosti (produkcije CO₂) s staranjem živali v časovnem obdobju primerljivem našemu. V isti študiji pa so zabeležili tudi zmanjševanje števila kopij mitohondrijske DNA s starostjo (Melvin in sod., 2007). Ferguson in sodelavci (2005), ki so analizirali mitohondrije izolirane iz toraksov *D. melanogaster*, nasprotno ugotavljajo zmanjševanje stopnje z ADP stimulirane (t. i. state 3) respiracije in upadanje aktivnosti citokrom c oksidaze s starostjo. Podobno upadanje aktivnosti citokrom c oksidaze s starostjo so pri *D. melanogaster* zabeležili že Schwarze in sodelavci (1998), ki so ugotovili še zviševanje peroksidacije lipidov in upadanje količine ATP s starostjo živali.

V naštetih študijah gre večinoma za meritve v izoliranih mitohondrijih iz homogenatov celotnih živali, pri poskusih na muhah vrste *C. vicina* (Jenko, 2007, Meglič, 2009) pa za meritve *in vivo* v očesu živali, z isto metodologijo kot v naših poskusih. Zato smo pričakovali večjo skladnost naših rezultatov s slednjimi.

Naši rezultati dejansko kažejo naraščanje koncentracije nekaterih dihalnih pigmentov s starostjo, a niso popolnoma v skladu z našimi pričakovanji. Če rezultate normiramo in jih primerjamo z rezultati poskusov na muhah (*C. vicina*, Meglič, 2009) opazimo tri ključne razlike (Slika 14). Prva je ta, da se dihalni aparat pri vinskih mušicah očitno po izleganju odrasle muhe spreminja v manjši meri, kot je bilo to opaženo pri muhah. Druga razlika je v časovnem poteku sprememb. Tudi pri citokromih c in a, kjer je naraščanje koncentracije s starostjo očitno, gre za postopno naraščanje in ne za skokovit porast v prvem tednu starosti, kot bi pričakovali glede na rezultate meritev pri *C. vicina*. Tretja, najočitnejša razlika pa so rezultati za citokrom a₃. Ta se pri *C. vicina* vede podobno kot ostali trije hemi, med tem ko so spremembe koncentracije reducirane oblike a₃ pri *D. melanogaster* mnogo nižje. V nekaterih poskusih hem a₃ ob anoksiji pri *D. melanogaster* celo (navidezno) oksidira.

Niven in sodelavci (2007) so preučevali energijske zahteve in informacijsko učinkovitost fotoreceptorjev (natančneje celic R1-R6) pri različnih muhah. Pri hitreje letečih muhah z večjimi očmi (*Calliphora* in *Sarcophaga*) kodirajo celice R1-R6 pri dnevni svetlobi približno 1000 bitov informacij na sekundo, pri manjših vinskih mušicah (*D. melanogaster*) pa zgolj 200 bitov na sekundo. Večjo učinkovitost kodiranja informacij spremlja tudi večja prevodnost membrane ter večja poraba energije tako v temi kot ob svetlobnem draženju. Poraba energije v temi je pri muhah znašala okoli $2 \cdot 10^9$ molekul ATP/s, pri *D. melanogaster* pa $1 \cdot 10^8$ molekul ATP/s. Z naraščajočo jakostjo dražilne svetlobe je naraščala hitrost kodiranja informacij in poraba energije. Slednja je pri *C. vicina* dosegla maksimalno vrednost okoli $7 \cdot 10^9$ ATP/s in pri *D. melanogaster* okoli $2 \cdot 10^8$ ATP/s. Petkrat večja informacijska učinkovitost, torej sovпада z dvajsetkrat večjo mirovno energijsko porabo in petintridesetkrat večjo maksimalno energijsko porabo fotoreceptorskih celic pri *C. vicina*.

S temi podatki lahko deloma razložimo razliko v dozorevanju celičnega dihalnega aparata pri *C. vicina* in *D. melanogaster*. Pri velikih, hitro letečih muhah vrste *C. vicina*, se slika okoliških predmetov (oz. kot pod katerim pada na mušje oko) zelo hitro spreminja. Zato potrebujejo učinkovitejši sistem za kodiranje vidnih informacij od vinskih mušic, ki so manjše in se počasneje. Večja informacijska učinkovitost pa terja več energije.



Slika 14: Primerjava rezultatov pri vinskih mušicah in muhah. Vsi rezultati so normirani na najvišjo vrednost. Rezultati za muhe (*Caliphora vicina*, Meglič 2009) so predstavljeni v svetlo rdeči (muhe gojene na 12/12 ciklu) in temno rdeči (muhe gojene v temi). Rezultati za vinske mušice so predstavljeni v modri barvi.

Domnevamo, da sta obseg in hitrost spreminjanja koncentracije dihalnih pigmentov v prvih tednih po izleganju odziv na energijske zahteve fotoreceptorjev. Receptorske celice muhe (*C.vicina*) morajo po izleganju doseči visoko informacijsko učinkovitost, ki jo terja (hitro leteti) 'življenjski slog' te živali. Zato morajo muhe v očesu v čim krajšem času čim boljše

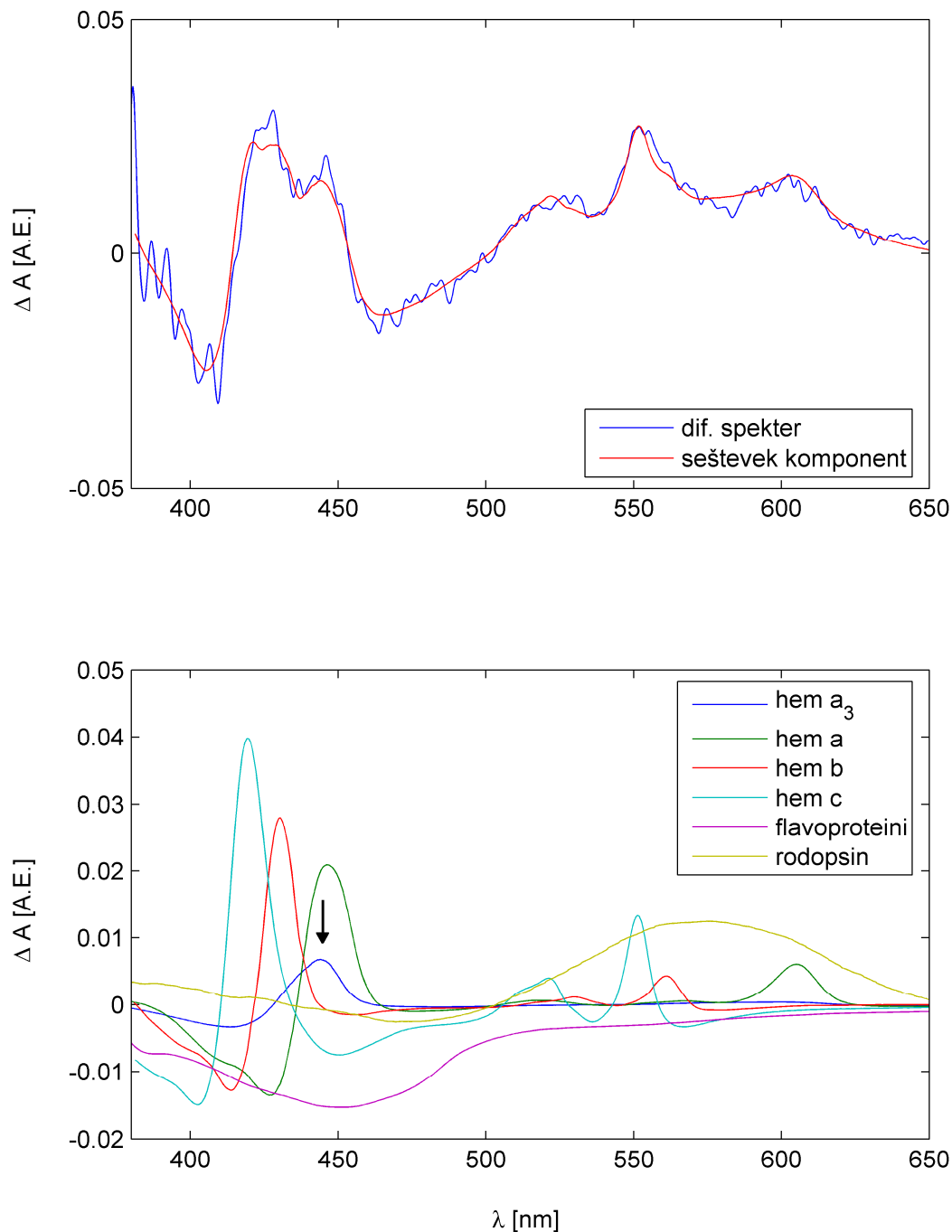
razviti celični dihalni aparat, ki bo zadostil visokim energijskim potrebam receptorskih celic. To lahko med drugim dosežejo s hitrim povečanjem koncentracije dihalnih pigmentov v mitohondrijih. Sklepamo, da je manj obsežno in počasnejše spreminjanje celičnega dihalnega aparata pri vinskih mušicah, posledica manjše stopnje informacijske učinkovitosti, ki jo mora oko doseči.

Osredotočimo se še na razliko v rezultatih za hem a_3 . Odgovor tega pigmenta na anoksijo ima pri *D. melanogaster* zelo nizko, včasih celo negativno amplitudo. Zaradi nizke amplitude odgovora sklepamo, da je hem a_3 že v atmosferskih pogojih močno reduciran. To potrjuje tudi analiza diferenčnih spektrov. Sprememba v absorpciji in s tem sprememba koncentracije reducirane oblike hema a_3 je zelo nizka v primerjavi z ostalimi dihalnimi pigmenti. (Slika 15) Tudi v primerjavi s surovim spektrom in diferenčnimi spektri pri *C. vicina* (Zupančič, 2003, Slika 16) takoj opazimo razliko. Vrh v surovem spektru pri cca. 450 nm, ki sovpada z vrhom absorpcije diferenčnega spektra hema a_3 je pri *C. vicina* neprimerljivo višji kot pri *D. melanogaster*.

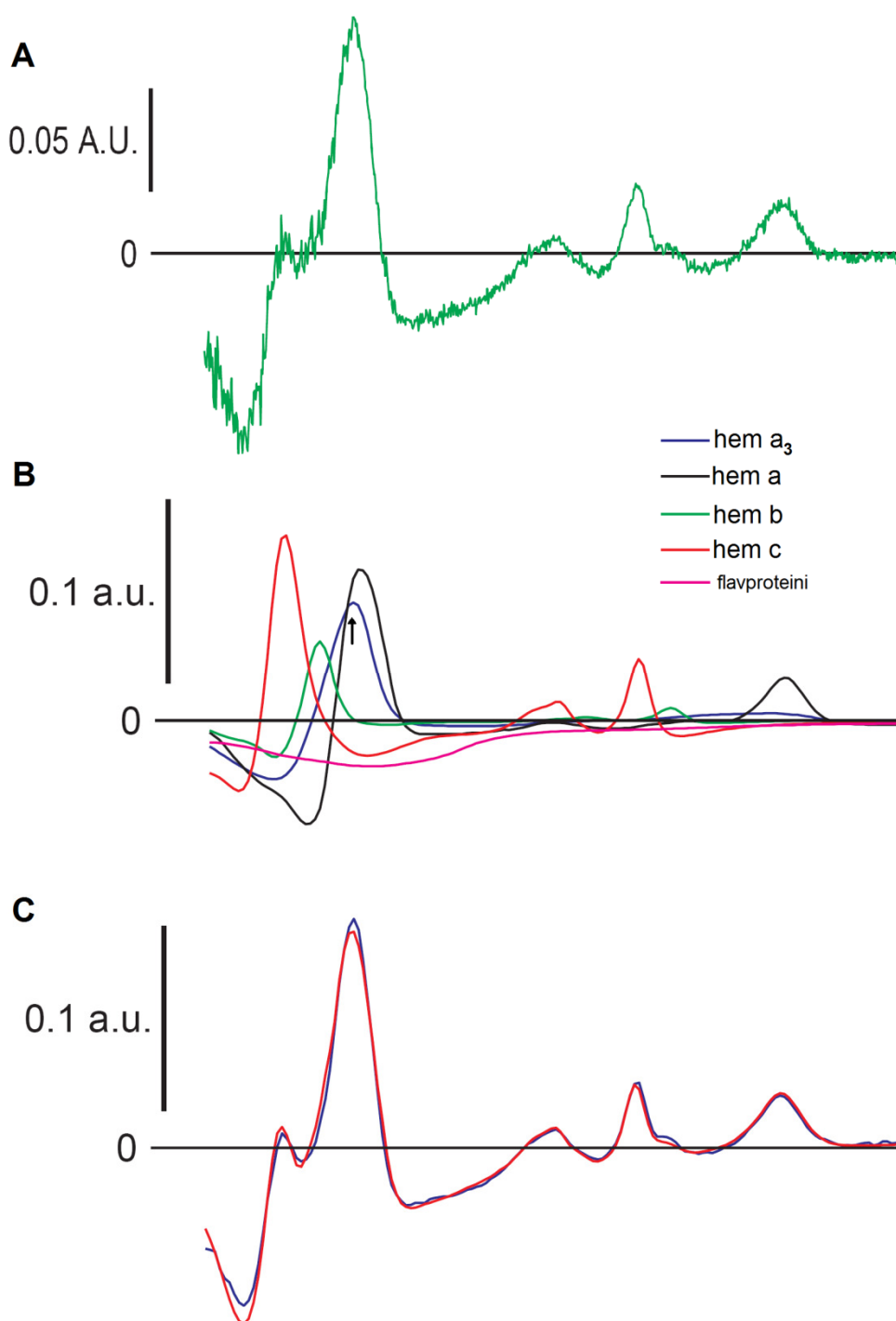
Vzrok za visoko stopnjo redukcije hema a_3 pri vinskih mušicah (v atmosferskih pogojih) je lahko visok mitohondrijski membranski potencial, zaradi katerega kompleks IV težje črpa protone in posledično zadržuje elektrone, ki jih ne more predati kisiku. Ker je sklopitev obeh reakcij v kompleksu IV vezana ravno na hem a_3 in center CuB (Wickstrom, 2004), katerega redoks stanja sicer nismo spremljali, zelo verjetno hem a_3 ostaja v pretežno reduciranem stanju. Visok mitohondrijski membranski potencial bi ustrezal tudi razmeroma nizki mirovni porabi fotoreceptorjev pri *D. melanogaster*, ki jo beležijo Niven in sodelavci (2007) v primerjavi z visoko mirovno porabo pri *C. vicina*. V prihodnje bi bilo zato nedvomno zanimivo preučiti tako morebitno spreminjanje mitohondrijskega membranskega potenciala, kot tudi spreminjanje časovnih konstant in mirovnih prevodnosti receptorskih celic s starostjo pri obeh živalih.

Zakaj je amplituda odgovora na anoksijo pri a_3 včasih negativna ne moremo točno pojasniti. Možno je, da gre le za napako pri poskusu ali obdelavi spektra. V nasprotnem primeru gre v nekaterih poskusih dejansko za oksidacijo hema a_3 v anoksiji. Trenutno ne poznamo dobre razlage za ta pojav. Vsekakor bi bilo vredno podrobneje preučiti tudi hem a_3 pri

vinskih mušicah, saj se njegov odziv očitno razlikuje od odziva istega hema pri sorodnih *C. vicina*.



Slika 15: Surovi in diferenčni spekter hemov v dušiku pri *D. melanogaster*. Na zgornjem grafu sta prikazana diferenčni spekter (modro) in (izračunani) seštevek komponent (rdeča) enega od naših poskusov. Na spodnjem grafu so z različnimi barvami prikazani obteženi diferenčni spektri posameznih dihalnih pigmentov. Faktor obtežitve predstavlja stopnja redukcije glede na začetno stanje. Absorpcijski vrh hema a_3 je označen s puščico (temno modra krivulja). (sliko izdelal Zupančič G.)



Slika 16: Surovi in diferenčni spekter hemov v dušiku pri *C. vicina*. **A:** Surovi spekter. **B:** Z različnimi barvami so prikazani obteženi diferenčni spektri posameznih dihalnih pigmentov. Faktor obtežitve predstavlja stopnja redukcije glede na začetno stanje. Absorpcijski vrh hema a₃ je označen s puščico (modra krivulja). **C:** Filtrirani spekter (modro) in reproducirani seštevek komponent (rdeče). (povzeto po Zupančič, 2003.)

6 POVZETEK

Za delovanje fotoreceptorskih celic in za vzdrževanje ionskih gradientov preko plazemske membrane je potrebna znatna količina metabolne energije v obliki fosfatnih vezi molekule ATP. To energijo zagotavlja predvsem oksidativni metabolizem v mitohondrijih. Poskusi na muhah (*Calliphora vicina*) so pokazali, da se po izleganju iz bube metabolni aparat še vedno razvija. Zlasti očitno je povečanje koncentracije dihalnih pigmentov v očesu v prvem tednu po izleganju. Dozorevanje metabolnega aparata najverjetneje vpliva tudi na delovanje procesa fototransdukcije. Namen naloge je bil odkriti, ali je dozorevanje celičnega dihalnega aparata v očesu podobno tudi pri vinskih mušicah (*Drosophila melanogaster*), ki so standardni objekt za študij tako fototransdukcije pri žuželkah kot tudi procesov razvoja in staranja. Za spremljanje funkcionalnih lastnosti dihalnih pigmentov smo uporabili metodo dinamičnih spektrofotometričnih meritev sprememb spektralne absorpcije. Izmerjene diferenčne spektre smo analizirali s pomočjo spektralne dekonvolucije in uporabe metode poglavitnih komponent. Pri različno starih živalih smo ocenili relativno razliko v koncentraciji dihalnih pigmentov, tako da smo izmerili velikost razlik med redoks stanji hemov a, a₃, b in c med normalno in čisto dušikovo atmosfero. Ugotovili smo da se tudi pri vinskih mušicah koncentracija dihalnih pigmentov po izleganju povečuje, a v mnogo manjšem obsegu in počasneje kot pri muhah. Razlike so po našem mnenju posledica razlik v življenjskem slogu obeh vrst. Za muhe vrste *C. vicina* je namreč značilna visoka mirovna poraba, ki zagotavlja večjo informacijsko učinkovitost kodiranja vidne informacije potrebno za njihov (hitro leteč) življenjski slog. Poleg tega lahko iz rezultatov sklepamo na visoko stopnjo redukcije hema a₃ v atmosferskih pogojih pri *D. melanogaster*.

7 VIRI

- Ackrell B. A.C. 2002. Cytopathies involving mitochondrial complex II. *Molecular Aspects of Medicine*, 23: 369–384.
- Chyb S., Raghu P., Hardie R.C. 1999. Polyunsaturated fatty acids activate the *Drosophila* lightsensitive channels TRP and TRPL. *Nature*, 379: 255-259.
- Crofts A.R. 2004. Proton coupled electron transfer at the Q_o –site of bc1 complex controls the rate of ubiquinone oxidation. *Bioch. et Biophys. Acta*, 1655:77-92.
- Čehovin A. 2004. Dinamični odgovor elementov dihalne verige ob skočnih spremembah P_{O2} pri muhah *Calliphora erythrocephala* in *Drosophila melanogaster*: diplomsko delo: univerzitetni študij.
- Detmer S.A., Chan D.C. 2007. Fncions and disfunctions of mitochondrial dynamics. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 8:870-879.
- Dimroth P., Von Ballamoos C., Meier T. 2006. Catalytic and mechanical cycles in F-ATP synthases. *EMBO reports*, 7(3):276-282.
- Ferguson M., Mockett R. J., Shen Y., Orr W. C., Sohal R. S. 2005. Age-associated decline in mitochondrial respiration and electron transportin *Drosophila melanogaster*. *Biochem. J.*, 390: 501–511.
- Freidrich T., Scheide D. 2000. The respiratory complex I of bacteria, archaea and eukarya and its module common with membrane-bound multisubunit hydrogenases. *FEBS Lett.*, 479 (1-2): 1-5.
- Hardie R. 1986. The Photoreceptor Array of Dipterian Retina. *Tends in Neuroscience*, 9: 419-423.
- Hägerhäll C. 1997. Succinate: quinine oxidoreductases: Variations on a conserved theme. *Bioch. et Biophys. Acta*, 1320: 170-141.
- 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.
- Horridge G.A. 1987. The evolution of visual processing and the construction of seeingsystems. *Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci.*, 230: 279-292.
- Howard J., Blakeslee B., Laughlin S. B. 1987. The intracellular pupil mechanism and photoreceptor signal-noise ratios in the fly *Lucilia cuprina*. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 231: 415-435.

- Jenko K. 2007. Od starosti odvisne spremembe dinamike odziva dihalne verige na fiziološko obremenitev očesa muhe (*Calliphora vicina*): diplomsko delo: univerzitetni študij.
- Katz B., Minke B. 2009. *Drosophila* photoreceptors and signaling mechanisms. Front. in Cellular Neuroscience, 3: 2.
- Laughlin S. B., van Steveninck R. R. D., Anderson J. C. 1998. The metabolic cost of neural information. Nat. Neurosci. 1, 36-41.
- Link T.A., Schägger H., von Jagov. 1986. Analysis of the structures of the subunits of the cytochrome bc₁ complex from beef heart mitochondria. FEBS Lett., 204:9-15.
- Meglič A. 2009. Povezave med procesoma fototransdukcije in aktivacije mitohondrijev pri dvokrilcih (Insecta: Diptera): doktorska disertacija.
- Melvin R. G., Von Voorhies W. A., Ballard J. W. O. 2007. Working harder to stay alive: Metabolic rate increases with age in *Drosophila simulans* but does not correlate with life span. Journal of Insect Physiology, 53: 1300–1306.
- Niven J.E., Anderson J.C., Laughlin S.B. 2007. Fly Photoreceptors Demonstrate Energy-Information Trade-offs in Neural Coding. PLOS Biology, vol. 5: iss. 4. e116.
- Niven J.E., Laughlin S.B. 2008. Review: Energy limitation as a selective pressure on the evolution of sensory systems. The Journal of Experimental Biology, 211: 1792-1804.
- Pangeršič T., Stušek P., Belušič G., Zupančič G. 2005. Light dependence of oxygen consumption by blowfly eyes recorded with a magnetic diver balance. J. Comp. Physiol. A 191, 75-84.
- Schwarze S. R., Weindruch R., Aiken J.M. 1998. Oxidative stress and aging reduce COX I RNA and cytochrome oxidase activity in *Drosophila*. Free Radical Biology & Medicine, 25, 6: 740–747.
- Seelert H., Dani D.N., Dante S. , Hauß T., Krause F., Schäfer E., Frenzel M., Poetsch A., Rexroth S., Schwaßmann H.J., Suhai T., Vonck J., Dencher N.A. 2009. From protons to OXPHOS supercomplexes and Alzheimer's disease: Structure–dynamics–function relationships of energy-transducing membranes. Bioch. et Biophys. Acta, 1787: 657–671.
- Stavenga D. G. 1995. Insect retinal pigments: Spectral characteristics and physiological functions. V: Progress in retinal and Eye Rs. Elsevier Science LTd, Velika Britanija: 15: 231-259.

- Yano T., 2002. The energy-transducing NADH: quinone oxidoreductase, complex I. *Molecular Aspects of Medicine*, 23: 345–368.
- Wang T., Montell C. 2007. Phototransduction and retinal degeneration in *Drosophila*. *Pflugers Arch.*, 454(5): 821-847.
- Wickström M. 2004. Cytochrome c oxidase: 25 years of the elusive proton pump. *Bioch. et Biophys. Acta*, 1655: 241– 247.
- Wu M., Wang M., Nix J., Hryshko L.V., Zheng L. 2009. Crystal Structure of CBD2 from the *Drosophila* Na⁺/Ca²⁺ Exchanger: Diversity of Ca²⁺ Regulation and Its Alternative Splicing Modification. *J. Mol. Biol.* 387, 104–112.
- Zupančič G. 2003. A method for spectrophotometric measurements in vivo using principal component analysis-based spectral deconvolution. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, 447:109-199.

ZAHVALA

Zahvaljujem se članom komisije: prof. dr. Kazimirju Drašlarju, doc. dr. Roku Kostanjšku in doc. dr. Gregorju Zupančiču za pregled naloge in koristne nasvete. Še posebej se zahvaljujem svojemu mentorju doc. dr. Gregorju Zupančiču za spodbudo in aktivno pomoč pri nastajanju naloge. Hvala tudi Suzani Logar, doc. dr. Petru Stušku, asist. dr. Gregorju Belušiču, dr. Andreju Megliču in dr. Alešu Škorjancu, zaradi katerih sem se na katedri vedno počutila dobrodošlo.

Prav tako se zahvaljujem vsem prijateljem in kolegom, ki so me spodbujali, zlasti Danieli in Milošu za vse kavice in prijazne besede.

Ta naloga gotovo ne bi bila pred vami, če moja starša Marino in Smilja ne bi že od malega ljubeče vzgajala mojega raziskovalnega duha in me naučila, naj vedno mislim s svojo glavo. Za vse se jima iz srca zahvaljujem.

Največja zahvala, pa gre 'mojima fantoma'. Sinu Boru Andreju se zahvaljujem, ker je bil najboljša in najprikupnejša motivacija, možu Martinu pa za absolutno podporo in skoraj nadčloveško mero potrpežljivosti in ljubezni.

Hvala vsem.

PRILOGE

Priloga 1

Starost [dni]	hem b [μMcm]	hem c [μMcm]	hem a [μMcm]	hem a ₃ [μMcm]	N
0	0,164 ± 0,011	0,415 ± 0,039	0,264 ± 0,029	0,032 ± 0,015	7
1	0,179 ± 0,009	0,429 ± 0,018	0,236 ± 0,011	0,016 ± 0,004	9
2	0,190 ± 0,007	0,463 ± 0,018	0,264 ± 0,015	-0,003 ± 0,008	10
3	0,194 ± 0,011	0,471 ± 0,031	0,265 ± 0,014	-0,012 ± 0,013	8
5	0,191 ± 0,010	0,521 ± 0,030	0,279 ± 0,013	0,011 ± 0,011	10
7	0,191 ± 0,010	0,565 ± 0,021	0,328 ± 0,017	0,003 ± 0,004	9
9	0,228 ± 0,024	0,555 ± 0,031	0,322 ± 0,018	-0,003 ± 0,013	8
11	0,202 ± 0,014	0,576 ± 0,026	0,316 ± 0,013	0,045 ± 0,009	12
14	0,195 ± 0,015	0,554 ± 0,022	0,363 ± 0,021	0,026 ± 0,014	9
17	0,195 ± 0,015	0,554 ± 0,022	0,363 ± 0,021	0,026 ± 0,014	9
19	0,226 ± 0,013	0,631 ± 0,026	0,378 ± 0,018	0,032 ± 0,010	10
21	0,200 ± 0,018	0,601 ± 0,028	0,416 ± 0,034	0,036 ± 0,022	6

Tabela 1: Podatki za sliko 12.

Priloga 2

Starost [dni]	hem b [s ⁻¹]	hem c [s ⁻¹]	hem a [s ⁻¹]	N
0	0,028 ± 0,002	0,032 ± 0,004	0,032 ± 0,003	7
1	0,029 ± 0,002	0,039 ± 0,003	0,036 ± 0,003	9
2	0,038 ± 0,002	0,036 ± 0,002	0,036 ± 0,003	10
3	0,045 ± 0,002	0,035 ± 0,003	0,037 ± 0,003	8
5	0,034 ± 0,003	0,038 ± 0,004	0,035 ± 0,003	10
7	0,042 ± 0,004	0,035 ± 0,003	0,039 ± 0,003	9
9	0,042 ± 0,003	0,040 ± 0,005	0,041 ± 0,004	8
11	0,038 ± 0,003	0,037 ± 0,002	0,038 ± 0,003	12
14	0,040 ± 0,004	0,036 ± 0,002	0,037 ± 0,003	9
17	0,041 ± 0,004	0,036 ± 0,002	0,037 ± 0,003	9
19	0,036 ± 0,003	0,035 ± 0,002	0,032 ± 0,002	10
21	0,036 ± 0,002	0,035 ± 0,003	0,032 ± 0,003	8

Tabela 2: Podatki za sliko 13.