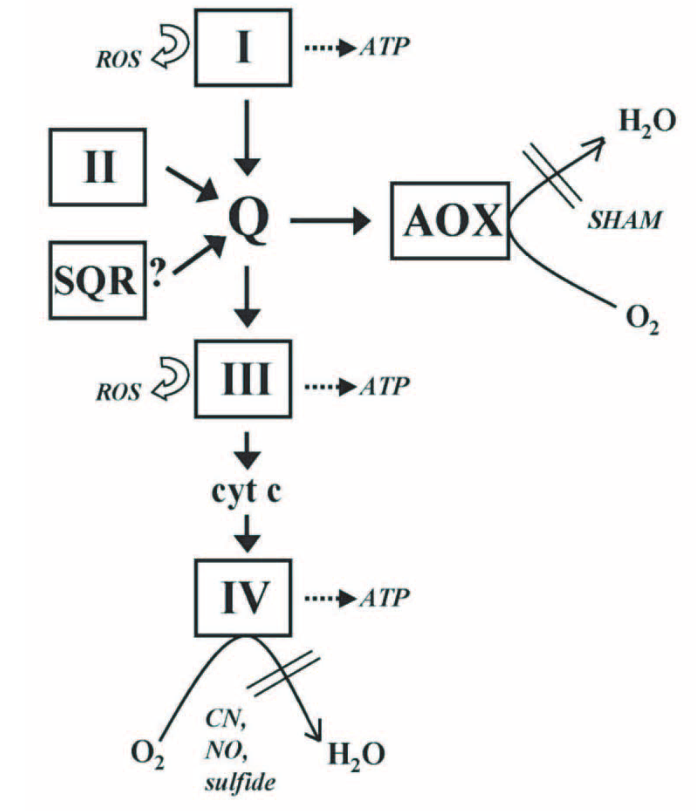
# Wstęp

Alternatywna oksydaza (AOX) jest białkiem wewnętrznej błony mitochondrialnej. Enzym ten zapewnia elektronom w mitochondriach transport alternatywną ścieżką podczas łańcucha oddechowego, poprzez przeprowadzenie utleniania *ubiquinol(ubichinon)* i redukcję O2 do H2O. Oksydaza alternatywna przenosi elektron na tlen, pomijając kompleks III i kompleks IV (pub. 3, tutaj rysunek). Taki mechanizm, potocznie nazywany oddychaniem niewrażliwym na cyjanek, powszechny u roślin, grzybów i pierwotniaków, jest także obecny u niektórych zwierząt. Enzym ten wykorzystywany jest podczas pojawienia się w łańcuchu oddechowym inhibitora oksydazy cytochromowej, na przykład wyżej wymienionego cyjanku.   
Według nowo opublikowanych artykułów naukowych zawierających analizy materiału genetycznego niektórych niesporczaków, organizmy te również kodują i produkują alternatywną oksydazę (pub. 1, 2, 6). Pierwotnie AOX ma pochodzenie roślinne, gdzie wykorzystywana jest do podnoszenia temperatury organizmu w warunkach stresu termicznego, co u niektórych taksonów może skutkować zwiększeniem wydzielania substancji mających na celu zwabianie owadów.



*Rysunek 1. Schemat transportu elektronu w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym z wykorzystaniem AOX.   
Kompleksy I, III i IV są siłą napędową pośrednio powodującą wytworzenie ATP. Zablokowanie kompleksu II   
nie powoduje zatrzymania procesu.*

# Cele

Głównym powodem stworzenia tej pracy było eksperymentalne udowodnienie istnienia tego enzymu u poszczególnych gatunków niesporczaków.

# Metodyka

Przez pół roku hodowano gatunki *Hipsibius dujardini* i *Milnesium tardigradum.* Hodowle prowadzi się na porysowanych szalkach, dzięki której niesporczaki mogą się przyczepić do podłoża. Zaobserwowano, że hodowle najlepiej się utrzymują w wodzie Żywiec Zdrój, dlatego z niej korzystano. Gatunek *H. dujardini* jest roślinożerny, dlatego też jako pożywienie stosowało się glony z rodziny *Scenedesmus. M. tardigradum* natomiast żywią się nicieniami *C. elegans* z hodowli prowadzonej przez doktora Roberta Sobkowiaka z Zakładu Biologii Komórki w Instytutu Biologii Eksperymentalnej Wydziału Biologii UAM*.* W czasie prowadzenia hodowli kilkukrotnie wprowadzano w stan baryłki i z powrotem w stan aktywny osobniki obu tych gatunków, by zapoznać się ze specyfiką tego procesu i dowiedzieć się, jakie warunki są potrzebne do osiągnięcia największej efektywności. Przeprowadzanie anhydrobiozy polega na wysuszeniu, stąd nazwa tego procesu. Umieszcza się niesporczaki w warunkach powolnie wysychającego środowiska, w cieplarce o warunkach TU PODAĆ WARUNKI. Dla *H. dujardini* (niesporczaki przechodzą w stan baryłki i można je wybudzić) przeprowadza się anhydrobiozę wykorzystując szalki z bibułą, gdyż dzięki niej wysychanie próby zachodzi najwolniej. Niemniej jednak gatunek ten nie znosi dobrze zmiany warunków, przez co jest małe prawdopodobieństwo wybudzenia jakiegokolwiek osobnika. Nie opracowano dotychczas optymalnego schematu postępowania dla tego gatunku, dlatego też na nim nie były prowadzone następne eksperymenty. Dla gatunku *M. tardigradum* można wykorzystać porysowane szalki z kroplą o objętości 400 µl lub 600 µl, w której te osobniki się znajdują. Przeżywalność jest znacznie wyższa niż u *H. dujardini.*

# Wyniki

## Eksperyment nr 1

Część populacji hodowli *M. tardigradum* wykorzystano do przeprowadzenia anhydrobiozy z użyciem inhibitora oksydazy alternatywnej BHAM. Wykorzystano 80 osobników,które po 10 sztuk umieszczano na porysowanych szalkachw kropli o objętości 400 µl wody i 1.2 µl odpowiedniego odczynnika. 4 próby przeprowadzono z działaniem pośrednim i 4 z działaniem bezpośrednim odczynnika. Próby zawierały kolejno:

* 400 µl wody (próba kontrolna), dalej nazywaną próbą 0;
* 400 µl wody i 1.2 µl rozpuszczalnika (MetOH, kontrola rozpuszczalnika),   
  nazywaną próbą 1;
* 400 µl wody i 1.2µl roztworu inhibitora AOX o stężeniu 1 mM w rozpuszczalniku,   
  nazywaną próbą 2;
* 400 µl wody i 1.2µl roztworu inhibitora AOX o stężeniu 3 mM w rozpuszczalniku,  
   nazywaną próbą 3.

Działanie bezpośrednie polegało na natychmiastowym wprowadzeniu w anhydrobiozę w mieszaninie wody i odczynnika. W działaniu pośrednim inkubowało się próby w wodzie z odczynnikami przez 2 godziny, następnie przenosiło się próby do czystej wody (2 ml) i czterokrotnie przepłukiwano odciągając pipetą 1ml wody i dodając 1 ml świeżej, by pozbyć się nadmiaru odczynnika. Dopiero po odpowiednim oczyszczeniu przeprowadzano anhydrobiozę. Po sześciu dniach przeprowadzono wybudzanie, tj. zalewano szalki czystą wodą. Liczono czas, jaki zajmuje odpowiednim osobnikom rozpoczęcie widocznej (nie fizjologicznej) rehydratacji, a następnie sprawdzano ilościową aktywność po odpowiednim czasie. Wyróżniono trzy rodzaje możliwych stanów niesporczaków po eksperymencie, kiedy nie zalano jeszcze próby wodą. Są to stany: stan martwy (kształt bardzo wydłużony, odnóża odstające na boki), stan baryłki (kulisty kształtem, ewidentnie różniący się od stanu martwego, osobnik jest ‘skupiony’, przypomina beczkę), i stan przejściowy (osobnik ma kształt nieco wydłużony, odnóża są schowane). Dla obserwacji po eksperymencie, lecz po zalaniu mamy cztery stany: aktywność (pełna ruchliwość osobnika, taka jak w normalnym środowisku), rozruch (nieznaczne ruchy, po dłuższym czasie przechodzące w ruchy ze stanu aktywności), stan martwy(osobnik nie rusza się, analogicznie jak powyżej), stan baryłki (analogiczny jak powyżej). Wyniki obserwacji opisano w tabeli.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Próba 0 | Próba 1 | Próba 2 | Próba 3 |
| **Obserwacja zawartości szalek przed zalaniem** | 10 w stanie baryłki | 8 w stanie baryłki, 2 martwe | 8 w stanie baryłki, 2 martwe | 9 martwych,  1 zaginiony |
| **Obserwacja pierwszego ruchu po zalaniu szalek** | Pierwszy ruch po 7 minutach | Pierwszy ruch po 13 minutach | Pierwszy ruch po 50 minutach | Brak jakichkolwiek ruchów |
| **Obserwacja po dwóch godzinach** | 8 osobników aktywnych | 7 osobników aktywnych | 2 osobniki w rozruchu | Brak jakichkolwiek ruchów |

*Tabela 1.* *Obserwacje kultury niesporczaków M. tardigradum po pierwszej anhydrobiozie z odczynnikiem BHAM działającym bezpośrednio*

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Próba 0 | Próba 1 | Próba 2 | Próba 3 |
| **Obserwacja zawartości szalek przed zalaniem** | 9 w stanie baryłki, 1 zaginiony | 10 w stanie baryłki | 8 w stanie baryłki, 2 zaginione | 9 baryłek, 1 zaginiony |
| **Obserwacja pierwszego ruchu po zalaniu szalek** | Pierwszy ruch po 9 minutach | Pierwszy ruch po 6 minutach | Pierwszy ruch po 8 minutach | Pierwszy ruch po 8 minutach |
| **Obserwacja po dwóch godzinach** | 8 osobników aktywnych | 7 osobników aktywnych | 2 osobniki w rozruchu | Brak jakichkolwiek ruchów |

*Tabela 2.* *Obserwacje kultury niesporczaków M. tardigradum po anhydrobiozie z odczynnikiem BHAM działającym pośrednio*

## Eksperyment nr 2

W drugim eksperymencie polegającym na poddaniu działaniu bezpośrednim inhibitorem BHAM dziesięciu niesporczaków *M. tardigradum* nie mierzono czasu pierwszego ruchu danego osobnika, lecz obserwowano daną szalkę po godzinie i po dobie dla uzyskania bardziej globalnego poglądu. Tak samo jak w poprzednim eksperymencie w czterech szalkach umieszczono po dziesięć niesporczaków w następujących stężeniach środowiska:

* 400 µl wody (próba kontrolna), dalej nazywaną próbą 0;
* 400 µl wody i 1.2 µl rozpuszczalnika (MetOH, kontrola rozpuszczalnika), nazywaną próbą 1;
* 400 µl wody i 1.2µl roztworu inhibitora AOX o stężeniu 0.1 mM w rozpuszczalniku,   
  nazywaną próbą 2;
* 400 µl wody i 1.2µl roztworu inhibitora AOX o stężeniu 1 mM w rozpuszczalniku,  
   nazywaną próbą 3.

Tym razem jednak nie przeprowadzono eksperymentu pośredniego, ponieważ wyniki pokazały, że działanie na niesporczaki w taki sposób przynosi znikome efekty.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Próba 0 | Próba 1 | Próba 2 | Próba 3 |
| **Obserwacja zawartości szalek przed zalaniem** | 10 osobników  w stanie baryłki | 10 osobników  w stanie baryłki | 5 w stanie baryłki, 5 w stanie przejściowym | 8 martwych,  2 w stanie przejściowym |
| **Obserwacja po godzinie** | 8 osobników aktywnych,  1 osobnik w stanie baryłki,  1 osobnik martwy | 7 osobników aktywnych,  3 osobniki w rozruchu | 5 osobników aktywnych,  3 osobniki w rozruchu,  2 osobniki martwe | 1 osobnik w rozruchu,  3 osobniki w stanie baryłki,  6 osobników martwych |
| **Obserwacja po dobie** | 9 osobników aktywnych,  1 osobnik martwy | 10 osobników aktywnych | 8 osobników aktywnych,  2 osobniki martwe | 1 osobnik w rozruchu,  3 osobniki w stanie baryłki,  6 osobników martwych |

*Tabela* *3*. *Obserwacje kultury niesporczaków M. tardigradum po drugiej anhydrobiozie z odczynnikiem BHAM działającym bezpośrednio*

# Dyskusja

# Bibliografia

1. Y. Yoshida, G. Koutsovuolos, D. R. Laetsch, L. Stevens, S. Kumar, D. D. Horikawa, K. Ishino, S. Komine, T. Kunieda, M. Tomita, M. Blaxter, K. Arakawa *Comparative genomics of the tardigrades Hypsibius dujardini and Ramazzottius varieoratus*
2. [Online] ensembl.tardigrades.org
3. A. E. McDonald, G. C. Vanlerberghe *Branched Mitochondrial Electron Transport in the Animalia: Presence of Alternative Oxidase in Several Animal Phyla*
4. T .[Shiba,](http://www.rcsb.org/pdb/search/smartSubquery.do?smartSearchSubtype=AdvancedAuthorQuery&exactMatch=false&searchType=All%20Authors&audit_author.name=Shiba,%20T.) Y. [Kido, K .](http://www.rcsb.org/pdb/search/smartSubquery.do?smartSearchSubtype=AdvancedAuthorQuery&exactMatch=false&searchType=All%20Authors&audit_author.name=Kido,%20Y.)[Sakamoto,](http://www.rcsb.org/pdb/search/smartSubquery.do?smartSearchSubtype=AdvancedAuthorQuery&exactMatch=false&searchType=All%20Authors&audit_author.name=Sakamoto,%20K.) D. K. [Inaoka,](http://www.rcsb.org/pdb/search/smartSubquery.do?smartSearchSubtype=AdvancedAuthorQuery&exactMatch=false&searchType=All%20Authors&audit_author.name=Inaoka,%20D.K.) C. [Tsuge,](http://www.rcsb.org/pdb/search/smartSubquery.do?smartSearchSubtype=AdvancedAuthorQuery&exactMatch=false&searchType=All%20Authors&audit_author.name=Tsuge,%20C.) R. [Tatsumi,](http://www.rcsb.org/pdb/search/smartSubquery.do?smartSearchSubtype=AdvancedAuthorQuery&exactMatch=false&searchType=All%20Authors&audit_author.name=Tatsumi,%20R.) G. [Takahashi,](http://www.rcsb.org/pdb/search/smartSubquery.do?smartSearchSubtype=AdvancedAuthorQuery&exactMatch=false&searchType=All%20Authors&audit_author.name=Takahashi,%20G.)   
   E. O. [Balogun,](http://www.rcsb.org/pdb/search/smartSubquery.do?smartSearchSubtype=AdvancedAuthorQuery&exactMatch=false&searchType=All%20Authors&audit_author.name=Balogun,%20E.O.) T. [Nara,](http://www.rcsb.org/pdb/search/smartSubquery.do?smartSearchSubtype=AdvancedAuthorQuery&exactMatch=false&searchType=All%20Authors&audit_author.name=Nara,%20T.) T. [Aoki,](http://www.rcsb.org/pdb/search/smartSubquery.do?smartSearchSubtype=AdvancedAuthorQuery&exactMatch=false&searchType=All%20Authors&audit_author.name=Aoki,%20T.) T. [Honma,](http://www.rcsb.org/pdb/search/smartSubquery.do?smartSearchSubtype=AdvancedAuthorQuery&exactMatch=false&searchType=All%20Authors&audit_author.name=Honma,%20T.) A. [Tanaka,](http://www.rcsb.org/pdb/search/smartSubquery.do?smartSearchSubtype=AdvancedAuthorQuery&exactMatch=false&searchType=All%20Authors&audit_author.name=Tanaka,%20A.) M. [Inoue,](http://www.rcsb.org/pdb/search/smartSubquery.do?smartSearchSubtype=AdvancedAuthorQuery&exactMatch=false&searchType=All%20Authors&audit_author.name=Inoue,%20M.) S. [Matsuoka,](http://www.rcsb.org/pdb/search/smartSubquery.do?smartSearchSubtype=AdvancedAuthorQuery&exactMatch=false&searchType=All%20Authors&audit_author.name=Matsuoka,%20S.)   
   H. [Saimoto,](http://www.rcsb.org/pdb/search/smartSubquery.do?smartSearchSubtype=AdvancedAuthorQuery&exactMatch=false&searchType=All%20Authors&audit_author.name=Saimoto,%20H.) A. L. [Moore,](http://www.rcsb.org/pdb/search/smartSubquery.do?smartSearchSubtype=AdvancedAuthorQuery&exactMatch=false&searchType=All%20Authors&audit_author.name=Moore,%20A.L.) S. [Harada,](http://www.rcsb.org/pdb/search/smartSubquery.do?smartSearchSubtype=AdvancedAuthorQuery&exactMatch=false&searchType=All%20Authors&audit_author.name=Harada,%20S.) K. [Kita](http://www.rcsb.org/pdb/search/smartSubquery.do?smartSearchSubtype=AdvancedAuthorQuery&exactMatch=false&searchType=All%20Authors&audit_author.name=Kita,%20K.) *Structure of the trypanosome cyanide-intensive alternative oxidase*
5. R. Pennisi, D. Salvi, V. Brandi, R. Angelini, P. Ascenzi, F. Polticelli *Molecular Evolution of alternative Oxidase Proteins: A Phylogenetic and Structure Modeling Approach*
6. F. M. Bemm, L. Burleigh, F. Foerster, R. Schmucki, M. Ebeling, C. Janzen,   
   T. Dandekar, R. Schill, U. Certa, J. Schultz *Draft genome of the Eutardigrade Milnesium tardigradum sheds light on ecdysozoan evolution*
7. B. Szal, Anna M. Rychter *Oksydaza alternatywna ­– niedokończona opowieść*
8. C. Błaszak *Zoologia: Bezkręgowce*

Spis treści

[Wstęp 1](#_Toc512353598)

[Cele 2](#_Toc512353599)

[Metodyka 3](#_Toc512353600)

[Wyniki 4](#_Toc512353601)

[Dyskusja 5](#_Toc512353602)

[Bibliografia 6](#_Toc512353603)