



PISMO POLSKIEGO TOWARZYSTWA PRZYRODNIKÓW IM. KOPERNIKA
WYDAWANE PRZY WSPÓŁDZIAŁE: AKADEMII GÓRNICZO-HUTNICZEJ,
MINISTERSTWA NAUKI I SZKOLNICTWA WYŻSZEGO, POLSKIEJ AKADEMII UMIEJĘTNOŚCI

TOM 115
ROK 132

PAŹDZIERNIK – LISTOPAD – GRUDZIEŃ 2014

ZESZYT 10–12
2610–2612

JAK OCHOTKI AFRYKAŃSKIE RADZĄ SOBIE Z NIEDOBOREM WODY?

Stanisław Knutelski, Ewelina Baran, Hubert Harańczyk, Kazimierz Strzałka (Kraków), Takashi Okuda (Tsukuba)

Bez wody nie byłoby życia na Ziemi, nie byłoby też pięknych krajobrazów, rozmaitych smacznych napojów, szumu fal morskich czy bębnienia kropeł deszczu o parapet. Organizm ludzki zawiera około 80% wody, która odgrywa ważną rolę w metabolizmie (reakcje chemiczne zachodzące w organizmie i w komórkach w celu utrzymania przy życiu) albo stanowi strukturalny element ciała. Dlatego też straty wody odpowiadającej tylko 10–12% wagi ciała człowieka jest krytyczna dla utrzymania życia. Większość organizmów po utracie około 50% całkowitej objętości wody, jaka jest w ich ciałach ginie, a człowiekowi trudno przeżyć nawet ponad 14-to procentowe odwodnienie. Są jednak organizmy, np. owady z rodziny ochotkowatych, które mogą przetrwać utratę nawet ok. 97% wody z ciała. Oczywiście w takim stanie odwodnienia normalny metabolizm jest zatrzymany. Żeby więc przetrwać w środowiskach, w których następują naturalne, okresowe niedobory wody, organizmy stosują różne strategie ewolucyjne, z których najczęściej występują dwie opisane poniżej.

Istotą pierwszej z nich jest zmniejszanie strat wody, czyli „unikanie wysuszenia” poprzez adaptacje fizjologiczne i morfologiczne. Przykładem są tu niektóre prapłetwce, dwudyszne ryby prapłażcokształtne żyjące w strumieniach i bagnach Afryki tropikalnej, które wysychają w okresie pory suchej. Ryby te mają dwa organy wymiany gazowej – płuco podzielone na dwie części oraz skrzela. Zanurzone

w wodzie oddychają skrzelami. Natomiast w niesprzyjających warunkach atmosferycznych, czyli podczas suszy, zakopują się w błocie i przechodzą w stan estywacji. W jej trakcie następuje zanik aktywności i obniżenie poziomu metabolizmu, co ułatwia tym zwierzętom przetrwanie okresu niedoboru wody lub pokarmu. W czasie suszy prapłetwec zamyka się w osłonce utworzonej z własnego śluzu, w której zostawia kilka otworów potrzebnych do wymiany powietrza, i wtedy oddycha płucami. Z nadejściem pory deszczowej funkcje życiowe ryby wracają do normy i z powrotem przechodzi ona na oddychanie tlenem rozpuszczonym w wodzie.

Druga strategia polega na przetrwaniu w stanie odwodnionym („tolerancja wysuszenia”), nieraz przez bardzo długi okres czasu. Jej najbardziej ekstremalnym przykładem anhydrobioza (patrz – słownik), czyli stan, podczas którego następuje skrajne ograniczenie funkcji życiowych organizmu. Anhydrobioza, choć nie jest zjawiskiem powszechnym, występuje u wielu różnych organizmów, zarówno prokariotycznych, jak i eukariotycznych, w tym jednokomórkowych i wielokomórkowych, np. u: bakterii, drożdży, wrotków, nicieni oraz niesporczaków i owadów. Jednym z największych przedstawicieli tej ostatniej grupy jest ochotka *Polypedilum vanderplanki*, zwana też ochotką śpiącą (z ang.: *Sleeping Chironomid*). Jest to gatunek owada (Insecta) z rzędu muchówek (Diptera) reprezentującego rodzinę ochotkowatych

(Chironomidae). W stadium doskonałym (dorosłe, *imago*) muchy te przypominają swoim wyglądem znane nam komary i często są z nimi mylone. Ochotka śpiąca występuje w wielu półpustynnych regionach Afryki. Podczas pory deszczowej żyje ona w stadium larwalnym w płytkich, tymczasowych zbiornikach naskalnych wypełnionych deszczówką, które w okresie pory suchej zwykle wysychają i w tym czasie następuje prawie całkowite jej odwodnienie (dehydratacja, desykcja). W stanie prawie całkowitego wysuszenia larwa ta jest zdolna przetrwać przez wiele miesięcy, a nawet lat, bez odżywiania się i pobierania wody ze środowiska. Dzięki wieloletnim badaniom, głównie profesora Takashiego Okuda (Tsukuba, Japonia), ochotka śpiąca *P. vanderplanki* stała się modelowym gatunkiem w poznawaniu zarówno samego zjawiska anabiozy (wstrzymywania aktywnego życia) u zwierząt, jak również mechanizmów umożliwiających komórkom i tkankom przechodzenie poprzez tak skrajne stany życiowe, jakim jest niemal totalne odwodnienie, wywołane cyklicznymi przemianami warunków środowiskowych, bez ponoszenia przy tym trwałych uszkodzeń morfologicznych i fizjologicznych. Spośród stosunkowo niewielu organizmów zdolnych do całkowitego zatrzymania procesów metabolicznych *P. vanderplanki* jest gatunkiem filogenetycznie najbliższym spokrewnionym z człowiekiem. Poznanie więc mechanizmów molekularnych rządzących procesem anabiozy u tego właśnie gatunku może w przyszłości przyczynić się np. do przedłużenia czasu przechowywania organów przeznaczonych do przeszczepów. Warto więc poznać bliżej *P. vanderplanki* oraz jego umiejętności w radzeniu sobie z tak ekstremalnie trudnymi warunkami życiowymi, których to umiejętności nie posiada organizm człowieka ani inne kręgowce.

Rozwój *Polypedium vanderplanki*

Cykl życiowy owadów o przeobrażeniu zupełnym (holometabolia), do których należą ochotki (Chironomidae), składa się z czterech etapów: jajo, larwa, poczwarka oraz imago (dorosły osobnik). Po złożeniu przez samicę do wody zapłodnionych jaj, otoczonych galaretowatą otoczką w złożu jajowym, wnet wylęgają się larwy. Gatunek ten w stadium larwalnym może żyć od dwóch tygodni do nawet kilkunastu lat, w zależności od warunków środowiskowych, głównie temperatury i dostępności wody. Następnie wchodzi w stadium poczwarki, w którym się rozwija maksymalnie kilka dni, przeobrażając się w dorosłego owada, podobnego do komara, choć ma on od niego

bardziej wydatne czułki i wydłużone przednie odnóża. Schemat cyklu życiowego *P. vanderplanki* wraz z procesem wejścia w stan anhydrobiozy przedstawiono na rycinie 1. W sprzyjających warunkach środowiska długość cyklu życiowego gatunku wynosi ok. 1 miesiąca, w tym: jaja – 2 dni, larwy – 3-4 tygodni, poczwarki – 1-2 dni, a *imago* – 2 lub 3 dni. Jednakże przetrwanie niekorzystnych warunków w odwodnionej formie możliwe jest tylko w stadium larwy, gdyż ani jaja, ani poczwarki, czy też osobniki dorosłe (*imagines*) nie są zdolne do całkowitego wysuszenia, a następnie powrotnego uwodnienia i funkcjonowania w pierwotnej formie.



Ryc 1. Cykl życiowy ochotki *Polypedium vanderplanki* z uwzględnieniem zjawiska odwodnienia (desykcja) i wejścia w stan anhydrobiozy oraz uwodnienia (rehydratacja) i powrotnego przejście do stanu aktywnego życia larwy (zmodyfikowano na podstawie: Cornette i Kikawada (2011). *The Induction of Anhydrobiosis in the Sleeping Chironomid: Current Status of Our Knowledge*).

Larwa aktywna (Ryc. 2) ostatniego stadium ochotki *P. vanderplanki* osiąga średnio 6,6 mm długości i ok. 1 mg wagi. Jej ciało jest lekko wygięte i wy-



Ryc 2. Pokrój ciała larwy ochotki afrykańskiej *Polypedium vanderplanki*: żywej, aktywnej – na lewo oraz wysuszonej, nieaktywnej – na prawo. Fot. S. Knutelski i E. Baran.

dłużone, posiada krótkie przydatki umiejscowione z przodu i z tyłu ciała ułatwiające poruszanie się, przyczepianie do podłoża i zdobywanie pokarmu,

którym są głównie bakterie i pierwotniaki. W zależności od ilości obecnej w ciele hemoglobiny przybiera ona kolor czerwony, brązowy lub czarny, oprócz głowy, która jest zwykle ciemniejsza od reszty ciała i w porównaniu z tułowiem oraz odwłokiem jest mała. To właśnie dzięki posiadaniu hemoglobiny – barwnika krwi podobnego do tego, jaki jest u człowieka, larwy mogą osiedlać się w środowiskach wodnych z obniżoną zawartością tlenu, np. na dnie zbiorników wodnych. Wymiana gazowa u larwy zachodzi poprzez naskórek, a hemoglobina pomaga rozprowadzić tlen wewnątrz ciała.

Larwa *P. vanderplanki* potrafi przetrwać skrajne warunki wysuszenia, przeżywając po usunięciu aż 97% wody z własnego ciała (Ryc. 2) wewnątrz cylindrycznych osłonek utworzonych z błota i własnej śliny (Ryc. 3). W momencie ponownego nawodnienia, już po niecałych 2 godzinach lub nieraz wcześniej, może



Ryc 3. Larwa *Polypedilum vanderplanki* w osłonce śluzowo-piaskowej na początku procesu odwodnienia (dehydratacji). Na podstawie Kikawada et al. 2005. *Factors Inducing Successful Anhydrobiosis in the African Chironomid Polypedilum vanderplanki: Significance of the Larval Tubular Nest*. *Integr. Comp. Biol.*, 45: 710–714).

ona powrócić do stanu żywotności (Ryc. 2) nawet po 17 latach przebywania w stanie anhydrobiozy, co jest dotychczasowym rekordem wśród anhydrobiotycznych zwierząt. Poddane procesowi wysuszenia przez Hintona – odkrywcę tego gatunku i przechowywane w szczelnie zamkniętych szklanych probówkach zawierających żel krzemionkowy larwy przetrwały długi okres. W stanie drastycznego odwodnienia larwy *P. vanderplanki*, oprócz tolerancji na ekstremalne wysuszenie, są odporne także na różne inne czynniki stresogenne. Wytrzymują na przykład skrajne wahania temperatur: od -227°C do $+102^{\circ}\text{C}$, zanurzenie w glicerynie i etanolu, wysoki poziom promieniowania gamma oraz długotrwałą ekspozycję na próżnię.

W latach 1950 i 1960 Hinton badał anhydrobiozę u *P. vanderplanki* pod względem fizjologicznym. Jednakże później badania tego zjawiska zostały przerywane na długi czas. Dopiero w 2000 roku grupa badawcza kierowana przez profesora Takashiego Okudę z National Institute of Agrobiological Sciences (NIAS) w Tsukubie (Japonia) opracowała udany system hodowlany *P. vanderplanki* i wznowiono poszukiwania mechanizmów leżących u podstaw anhydrobiozy.

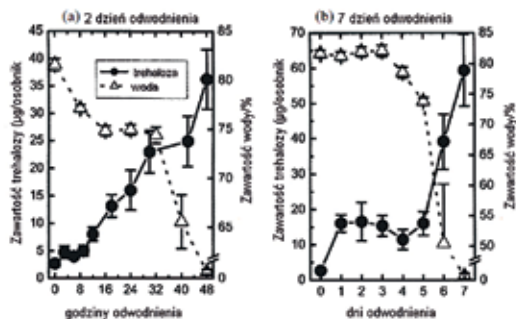
Ośrodek NIAS jest jednym z największych w Japonii ośrodków badawczych koncentrujących zainteresowania wokół nauk o życiu i zastosowaniu wyników badań realizowanych na tym obszarze w rolnictwie. W listopadzie 2013 roku została zawarta umowa o współpracy naukowo-technicznej w obszarze nauk medycznych oraz nauk o życiu (*life sciences*) pomiędzy tym ośrodkiem oraz Uniwersyteciem Jagiellońskim, mająca na celu prowadzenie wspólnych badań, m. in. właśnie nad procesem anhydrobiozy u larw *P. vanderplanki*. Wczesne eksperymenty grupy japońskiej wykazały, że indukcja anhydrobiozy jest możliwa w izolowanych tkankach i jest niezależna od centralnego układu nerwowego. Jednakże w celu osiągnięcia stanu anhydrobiozy larwy potrzebują reżimu powolnego wysuszenia, co pozwala im na syntezy cząsteczek trehalozy chroniących komórki i tkanki przed szkodliwym wpływem odwodnienia. Stwierdzono także związek między szybkością przejścia w stan odwodnienia, a wzrostem stężenia trehalozy w organizmie, o czym szerzej poniżej.

Warunki przejścia w stan anhydrobiozy

Wejście larwy ochotki śpiącej w stan anhydrobiozy zależy od tempa odwodnienia jej ciała. W warunkach laboratoryjnych skuteczna dehydratacja trwa około 48 godzin. W trakcie tego procesu zawartość wody zmniejsza się stopniowo od ok. 80% do 75% w ciągu pierwszych 16 godzin i jest utrzymywana na tym poziomie w ciągu następnych 16 godzin, a następnie gwałtownie spada do poziomu poniżej 3% w ostatnich 16 godzinach odwodniania. Podczas tego procesu larwy wyjmują się z wody, umieszcza na kawałkach bibuły filtracyjnej nawilżonej wodą destylowaną i kładzie się na szalce Petriego w eksykatorze o wilgotności względnej 5%, w temperaturze pokojowej. Taki protokół laboratoryjny wysuszenia daje podobny efekt jak w przypadku naturalnej dehydratacji. W warunkach naturalnych larwy, zanim rozpoczną proces dehydratacji, najpierw formują rurowe osłonki utworzone z drobnego piasku z dna zbiornika wodnego oraz z własnej śliny, którą osłonkę skleją (Ryc. 3). Tak skonstruowane „domki” wydają się utrzymywać mikroklimat z wystarczającą wilgotnością wokół larwy, umożliwiającą jej powolne wysuszenie aż do osiągnięcia pełnego stanu anhydrobiozy. W metodzie laboratoryjnej rolę takich osłonek spełnia papier filtracyjny, którego obecność indukuje proces wysuszenia, umożliwiając powolne odwodnienie spowodowane ciśnieniem pary wydzielanej z mokrej bibuły.

Zauważono, że szybkie osuszanie z reguły nie wywołuje anhydrobiozy u zwierząt. Ciało tłuszczowe

larwy powtórnie nawodnione po powolnej desykcacji wygląda podobnie do tego, które nie przeszło procesu odwadniania. Dla porównania, szybko wysuszane tkanki nie przeżyły całkowitej dehydratacji, gdyż nie mogły (nie zdążyły) zsyntezować trehalozy (patrz – słownik) oraz odpowiednich białek do poziomu niezbędnego do przywrócenia funkcji życiowych po nawodnieniu organizmu. Synteza trehalozy odgrywa ważną rolę w procesie anhydrobiozy. Zaobserwowano także odwrotnie proporcjonalną zależność ilości cukru (trehaloza) w stosunku do zawartości wody w trakcie odwodnienia (Ryc. 4). Wykazano również, że indukcja anhydrobiozy jest niezależna od ośrodkowego układu nerwowego. Dowodem na to jest fakt, że larwy poddane dekapitacji (odcięcie głowy) po ponownym nawodnieniu (rehydratacji) wykonywały typowe dla żywych larw ruchy wahadłowe. Może to wskazywać, że ani mózg, ani jego przydatki (*corpora allata*, *corpora cardiaca*) nie są zaangażowane w proces rehydratacji. Warto zauważyć jednak, że wchodzenie w stan wysuszenia wymaga szeregu reakcji fizjologicznych i zmian na poziomie molekularnym.



Ryc 4. Zmiany zawartości wody i trehalozy w larwie *Polypedilum vanderplanki* w czasie odwodnienia trwającego 2 oraz 7 dni (na podstawie: Okuda (2005). *Trehalose: a Molecule Responsible for Desiccation Tolerance in the Sleeping Chironomid, Polypedilum vanderplanki*).

Larwy *P. vanderplanki* wytwarzają enzymy przeciwutleniające (tzw. przeciwutleniacze) oraz inne związki chemiczne w celu złagodzenia stresu oksydacyjnego związanego z odwodnieniem komórek. Stres oksydacyjny towarzyszy przejściu w stan anhydrobiozy. W czasie jego trwania wytwarzane są reaktywne formy tlenu, które mogą prowadzić do karbonylowania białek, peroksydacji (utleniania) lipidów błonowych oraz do uszkodzenia DNA. Larwy oczyszczają organizm z reaktywnych form tlenu dzięki dysmutazie ponadtlenkowej oraz katalazie. Dysmutaza ponadtlenkowa przekształca wolne rodniki tlenowe w nadtlenek wodoru, który następnie jest redukowany do wody przez katalazy. Wytwarzane przez larwy przeciwutleniacze minimalizują uszkodzenia komórek.

Tolerancję larwy *P. vanderplanki* na anhydrobiozę umożliwiają również białka szoku cieplnego HSP (patrz – słownik), ponieważ zapobiegają denaturacji innych białek oraz przywracają aktywność już zdenaturowanym białkom. Funkcje HSP są podobne u wszystkich organizmów żywych. Działają one jak białka opiekuńcze odpowiedzialne za prawidłowe zwijanie się innych białek, ich oligomeryzację, translokację oraz degradację. Dotychczas wyizolowano kilka białek HSP związanych z regulacją procesu wysuszenia. Dwa z nich o masie cząsteczkowej poniżej 60 kDa zostały odkryte w dużych otorbionych zarodkach szeregu skrzelonogów (skorupiaki z grupy Branchiopoda). Wiele danych wskazuje na to, że aktywność tych opiekuńczych białek jest kluczowym czynnikiem powstawania trwałych i odpornych na stresi suchych torbieli. Nagromadzenie małych HSP zaobserwowano także w nasionach roślin. Znacznie mniej uwagi poświęcono natomiast większym białkom (HSP60, HSP70, HSP90 i HSP100), choć zauważono, że ekspresja niektórych z nich wzrasta u niesporczaków (Tardigrada) podczas ich wchodzenia w stan anhydrobiozy oraz wychodzenia z niego do stanu czynnej przemiany materii. Natomiast inne HSP nie wykazują wówczas wyraźnego wzorca zaangażowania w tych procesach. Po zbadaniu profili ekspresji poszczególnych rodzajów białek HSP u larw *P. vanderplanki* okazało się, że są one ściśle związane z anhydrobiozą.

Duży udział w odpowiedzi na stres wodny u *P. vanderplanki* mają także silnie hydrofilowe białka LEA (patrz – słownik), których obecność stwierdzono również w ciele wysuszonej larwy. W oparciu o ich strukturę i wzorzec ekspresji wyróżnia się trzy ich główne grupy. W wielu organizmach, które wykazują tolerancję na dehydratację, stwierdzono obecność takich białek, szczególnie należących do grupy 3. Co ciekawe, grupa ta wykazuje niezwykłą cechę – może zmieniać swoją strukturę w zależności od stopnia nawodnienia larwy. Białka LEA mogą działać także jako osłona podczas odwadniania cząsteczkowego. Analizy obliczeniowe sugerują, że grupa 3 białek LEA może pełnić potencjalne funkcje akceptora jonów do ochrony innych białek przed wysoleeniem i mieć udział we wzmocnieniu wytrzymałości mechanicznej odwodnionych komórek. Tak rozmaite funkcje białek LEA mogą zapewnić komórkom, jak i nawet całemu organizmowi, tolerancję na wysuszenie. U *P. vanderplanki* najsilniejszą ekspresję genów kodujących białka LEA stwierdzono właśnie w czasie dehydratacji larw. Sugeruje to, że są one niezbędne dla skutecznej anhydrobiozy tych organizmów. Białka LEA aktywnie uczestniczą również w procesie

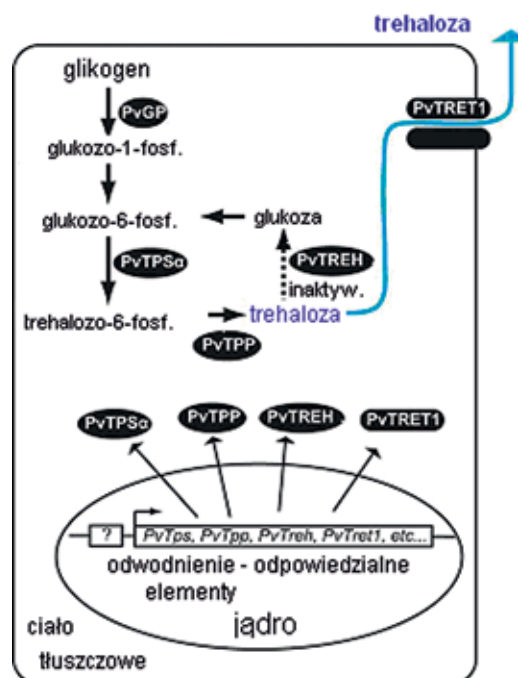
zeszklania (witryfikacji). Tworzą one matrycę stabilizującą trehalozę, co chroni cząsteczki biologiczne oraz integralność strukturalną larw podczas wysuszenia. Ten mechanizm zwalczania stresu odwodnienia jest wspólny zarówno dla zwierząt, roślin, jak również mikroorganizmów.

Trehaloza (patrz – słownik) jest węglowodanem chroniącym białka i błony przed uszkodzeniem w efekcie procesu dehydratacji poprzez mechanizmy, które opisują trzy hipotezy: 1) zastępowania wody związanej molekułami cukru, 2) „witryfikacji” (zeszklania matrycy trehalozowej) i 3) pułapkowania wody związanej w obrębie matrycy trehalozowej.

Pierwsza hipoteza sugeruje, że trehaloza wypiera wodę związaną zarówno z wewnątrz, jak i ze strony zewnętrznej odwadnianych błon fosfolipidowych, tworząc silne wiązania wodorowe, co ułatwia utrzymanie ich integralności. Z kolei druga sugeruje wywołane odwodnieniem powstawanie wewnątrzkomórkowej matrycy zeszkłonej trehalozy, co chroni cząsteczki i struktury komórkowe poprzez ograniczenie ich mobilności i zmniejszenie prawdopodobieństwa oddziaływania chemicznego i fizycznego. W konsekwencji chroni komórki przed zapadaniem się struktury poprzez wypełnienie przestrzeni pierwotnie zajmowanej przez wodę. Natomiast ostatnia z tych hipotez wskazuje, że podczas odwadniania trehaloza stabilizuje cienką warstwę wody związanej na powierzchni białka, zapobiegając denaturacji związanej z dehydratacją. Ponadto trehaloza tworzy stabilny kompleks z cząsteczkami fosfolipidów obecnych w błonach komórkowych, co chroni ich kwasy tłuszczowe przed utlenieniem w warunkach stresu środowiskowego. Trehaloza jest rozłożona równomiernie wewnątrz i na zewnątrz komórek larw dla ochrony wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych biomolekuł przed szkodliwym stresem wywołanym dehydratacją, aby larwa mogła wznowić metabolizm bez poważnych zmian fizjologicznych i uszkodzeń fizycznych. To oznacza, że trehaloza jest transportowana przez błony komórkowe i zajmuje miejsce po wodzie w tkankach w okresie desykcji.

U owadów trehaloza jest wytwarzana w komórkach tkanki tłuszczowej (Ryc. 5), następnie odprowadzana jest do hemolimfy, wreszcie przedostaje się do reszty ciała. Sugeruje to, że przenika ona przez błony komórkowe tkanki tłuszczowej. Niemniej dwuwarstwowe fosfolipidowe, podstawowe jednostki strukturalne błon komórkowych, są zasadniczo nieprzepuszczalne dla większości rozpuszczalnych w wodzie cząsteczek, takich jak jony, aminokwasy i węglowodany, w tym dla trehalozy. Jednakże w przenikaniu trehalozy przez błony komórkowe ohotki *P. vanderplanki*

pomagają transportery (białka błonowe przenoszące inne cząsteczki lub jony z jednej strony błony na drugą; biorą one udział w dyfuzji ułatwionej i procesach transportu aktywnego). U tej muchówki są to tzw. TRET1 (ang. *Trehalose transporter 1*). Mogą one zachowywać dużą zdolność do transportu treha-



Ryc. 5. Schemat komórki tłuszczowej larwy inicjującej syntezę trehalozy podczas indukcji anhydrobiozy (na podstawie: Cornette i Kikawada (2011). *The Induction of Anhydrobiosis in the Sleeping Chironomid: Current Status of Our Knowledge*).

lozy nawet kiedy jest ona wysoce skoncentrowana w ciele larwy w końcowym etapie wchodzenia w stan anhydrobiozy. W odwodnionym organizmie zeszkłona trehaloza jest rozmieszczona równomiernie w celu stabilizacji struktury biocząsteczek. Jednocześnie, poprzez wiązanie się bezpośrednio do błon komórkowych, umożliwia ona pozostanie błony w stanie ciekłokrystalicznym pomimo drastycznego ubytku wody. Te biofizyczne efekty wydają się być istotne dla skutecznej anhydrobiozy *P. vanderplanki*.

Wreszcie ostatnim ważnym czynnikiem umożliwiającym tolerancję ohotki śpiącej na całkowite jej wysuszenie są specyficzne kanały wodne, zwane akwaporynami (patrz – słownik), które przyspieszają odwodnienie. Woda nadzwyczaj powoli dyfunduje przez dwuwarstwowe fosfolipidowe błony komórkowe. Jednakże akwaporyny (AQP) ułatwiają proces przenikania dzięki pasywnemu transportowi kanałowemu wody.

Charakter naturalnych siedlisk (duże odosobnione skały z małymi zbiornikami wodnymi), słabe zdolności latania i silna selekcja spowodowana presją długiego (ok. 6 miesięcy) okresu pory suchej

w półpustynnych obszarach Afryki ułatwiły mikroewolucyjne przemiany w obrębie gatunku *P. vanderplanki*. Najnowsze wyniki badań *in vitro* (w warunkach laboratoryjnych, poza organizmem) wskazują na bezpośredni udział poszczególnych elementów rozbudowanych grup genów (jak np. białka LEA i przeciwutleniające) w neutralizowaniu skutków odwodnienia (desykcja). Inną możliwością jest nieadaptacyjny gen oparty na dryfie pochodzenia obserwowanych zmian w genomie *P. vanderplanki*. Przyszłe badania porównawcze na izolowanych populacjach tego gatunku z pewnością pomogą zweryfikować te hipotezy dla nowo nabytych cech i ewolucji anhydrobiozy u tego wyjątkowego owada.

Sporo już wiemy o anhydrobiozie, ale nadal nie wiadomo, jaki mechanizm molekularny odpowiada za udaną indukcję tego procesu oraz niezwykle właściwości wysuszonej larwy *P. vanderplanki*. Nie potrafimy tego procesu indukować, ani przeprowadzić na izolowanych tkankach czy komórkach *in vitro*. Nie jest nawet znany schemat budowy wewnętrznej *P. vanderplanki* w trakcie powrotu do stanu aktywnego po desykcji. Pozostaje jeszcze wiele innych pytań, na które należy znaleźć odpowiedź. Podczas gdy fizjologiczne i morfologiczne aspekty anhydrobiozy są stosunkowo dobrze opisane, mechanizmy molekularne umożliwiające takie naturalne zachowanie suchych organelli komórkowych i makrocząsteczek nie są do końca poznane. Dla pełnego zrozumienia mechanizmów procesu wysuszenia i rehydratacji wymagane są szersze badania przez zespół interdyscyplinarny. Potrzeba kompleksowego podejścia różnych naukowców specjalizujących się w biologii molekularnej, biochemii, fizjologii, biofizyce oraz prawdopodobnie informatyce. Już teraz niektórzy badacze są przekonani, że zrozumienie mechanizmów anhydrobiozy doprowadzi kiedyś do możliwości przechowywania w stanie suchym komórek zwierzęcych, tkanek, a nawet całych narządów. Gdyby zakończyło się to sukcesem, w co ufamy, wywołałoby to przełom w medycynie, np. w przechowywaniu narządów do przeszczepów, czy krwi w formie stałej. Ponadto lepsze zrozumienie mechanizmów leżących u podstaw anhydrobiozy pozwoli na nowe podejście do kwestii życia i śmierci.

Słownik

akwaporyna (AQP, z ang. aquaporin) – integralne białka błonowe, które tworząc kanały uczestniczą w procesie transportu wody oraz niektórych innych cząsteczek o podobnych rozmiarach, np. glicerolu, przez błony komórkowe organizmów żywych.

anhydrobioza – stan całkowitego odwodnienia i wysuszenia organizmu, faza życia utajonego, wywołany niedoborem odpowiedniej ilości wody, w którym następuje skrajne ograniczenie jego funkcji życiowych i zahamowanie metabolizmu; w takim stanie organizm zdolny jest przetrwać przez dłuższy czas bez pożywienia i wody; stan ten jest odwracalny przy sprzyjających warunkach naturalnych i wtedy następuje ponowne uwodnienie oraz całkowity powrót funkcji życiowych. Anhydrobiozę stwierdzono u: bakterii, protistów (głównie u pierwotniaków), mszaków, drożdży, porostów oraz niektórych zwierząt – wrotków, nicieni, niesporczaków oraz pewnych owadów; jednym z największych znanych zwierząt mogących wchodzić w stan anhydrobiozy jest *Polyphemus vanderplanki*, gatunek muchówki z rodziny ochotkowatych (Chironomidae); anhydrobioza bywa także nazywana stanem śmierci pozornej i jest przykładem adaptacji do środowiska.

HSP (ang. *Heat shock proteins*) – białka szoku cieplnego o silnie konserwatywnej sekwencji aminokwasów występujące u organizmów prokariotycznych i eukariotycznych, po raz pierwszy odkryte u muszki owocowej; ze względu na różną masę cząsteczkową (wyrażaną w kDa) wyróżnia się pięć głównych rodzin tych białek: niskocząsteczkowe, HSP60, HSP70, HSP90 i HSP100. Jest to grupa białek, których ekspresja wzrasta, kiedy komórki są narażone na działanie czynników stresowych, np.: podwyższonej lub niskiej temperatury, stresu solnego lub osmotycznego, metali ciężkich bądź odwodnienia. Masa HSP może wzrastać także w odpowiedzi na infekcję, zapalenie, działanie toksyn, promieniowanie UV, głodzenie, niedotlenienie, itp. Część HSP jest stale wytwarzana w komórce. Białka szoku cieplnego działają jak białka opiekuńcze odpowiedzialne za prawidłowe zwijanie się innych białek, ich oligomeryzację, translokację oraz degradację. Funkcje HSP są podobne u wszystkich organizmów.

LEA (ang. *Late-embryogenesis abundant proteins*) – grupa silnie hydrofilowych białek należących do większej grupy hydrofilin wytwarzanych podczas późnej embriogenezy roślin, zapewniających odporność na wysuszenie nasionom; rośliny wytwarzają LEA także podczas stresu wodnego, do zwiększonej ich syntezy dochodzi podczas suszy oraz mrozów; po raz pierwszy LEA zostały wyizolowane z nasion bawełny i opisane przez Leona Dura w 1981 roku. Później zostały wykryte także u wielu innych grup roślin oraz grzybów, a także u bakterii i archeowców, jak również u nicieni i ochotek reprezentujących

zwierzęta bezkręgowce. LEA są szeroko rozpowszechnione w organizmach tolerancyjnych na wysuszenie. Na podstawie podobieństw sekwencji LEA są grupowane w kilka rodzin. Wspólną ich cechą, poza wysoką hydrofilowością, jest duża zawartość glicyny oraz alaniny i seryny. Nie stwierdza się w nich obecności reszt cysteinowych i tryptofanowych. Chociaż udział białek LEA w odpowiedzi na stres wodny i niską temperaturę jest powszechnie znany, to sam mechanizm ochronny jeszcze nie jest poznany. Szczególną rolę LEA wydają się spełniać w ochronie błon mitochondrialnych przy silnym odwodnieniu komórki.

trehaloza (alfa-D-glukopiranozylo-(1→1)-alfa-D-glukopiranozyd) – cukier (dwucukier, disacharyd) o właściwościach nieredukujących, zbudowany z dwóch cząsteczek glukozy połączonych bardzo elastycznym wiązaniem α,α -1,1-glikozydowym, pozbawiającym ją właściwości redukujących; ma postać białego, bezwonnego proszku. Trehaloza została odkryta w 1832 roku przez H. A. L. Wiggersa w sporyszu żyta. W 1859 roku francuski chemik M. Berthelot nadał nazwę trehaloz substancji identycznej z cukrem grzybowym, wyizolowanej przez niego z kolebek poczwarkowych ryjkowca *Larinus onopordi*. Chrząszcz ten, zwany lokalnie także *trehala manna*, jest szeroko rozprzestrzeniony w bardzo ciepłych i suchych rejonach Morza Śródziemnego oraz Czarnego (Algieria, Tunezja, Syria, Liban, Iran, Egipt, Kaukaz, Cypr, Grecja, Turcja, Włochy, południowa Ukraina, dolny rejon Wołgi, południowy Kazachstan, Turkmenistan, Tadżykistan i południowa Europa), gdzie żyje głównie na przegorzanym kulistym *Echinops sphaerocephalus*, rzadziej na p. wschodnim *E. orientalis* (gatunki roślin z rodziny astrowatych). U chrząszczy, pustynnych roślin lub drożdży piekarniczych bądź piwnych pełni rolę substancji zapasowej, z której łatwo uwolnić glukozę. Trehaloza występuje niemal wszędzie: w komórkach grzybów, bakterii, nicieni, skorupiaków, owadów, jaj, poczwerek oraz niektórych roślin i jest głównym cukrem zapasowym. Wpływa na metabolizm, wzrost i rozwój rośliny, oddziałuje na alokację węgla, metabolizm węglowodanów, aktywność enzymów, fotosyntezę oraz ekspresję genów, działając nie tylko jako źródło glukozy, ale także jako analog sacharozy; daje takie same efekty jak sacharoza. Biosynteza trehalozy prowadzona jest różnymi znanymi szlakami

metabolicznymi, między innymi z wykorzystaniem enzymu syntazy trehalozy. Trehaloza pełni przede wszystkim funkcję zabezpieczającą integralność struktur komórkowych, w szczególności błon biologicznych. Jej działanie polega na zabezpieczeniu struktury białek lub dwuwarstwowych błon lipidowych poprzez wytwarzanie wiązań wodorowych pomiędzy grupami hydroksylowymi cukrów a polarnymi grupami białek bądź fosfolipidami błony. Trehaloza jest cukrem o wysokiej termostabilności oraz odporności na hydrolizę w kwaśnym środowisku i jako cukier nieredukujący nie uczestniczy w reakcji Maillarda. Wykazuje również wysoką hydrofilność i stabilność chemiczną. Obecnie uważa się, że nie tylko sama trehaloza i produkty jej metabolizmu służą jako sygnały w mechanizmie wyczuwania cukrów (ang. *sugar sensing*), uczestniczą w nim także intermedyaty biosyntezy trehalozy, głównie trehalozo-6-fosforan. Struktury trehalozy i cukrozy (sacharozy) – popularnego cukru z naszych cukierniczek, są do siebie zbliżone. Oba te cukry, będące źródłem węgla i energii, nie posiadają właściwości redukujących, przy czym w cukrozie cząsteczki glukozy i fruktozy połączone są wiązaniem α,β -1,2-glikozydowym. W porównaniu z cukrozą, trehaloza ma niższą higroskopijność, co umożliwia ochronę białek poprzez tworzenie niehigroskopijnego „szkliwa” na ich powierzchni. Trehaloza jest dobrze rozpuszczalna w wodzie, jednak charakteryzuje się trzykrotnie niższą rozpuszczalnością niż cukroza. Właściwości trehalozy dają możliwości jej rozlicznych zastosowań, zarówno w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i kosmetycznym, jak również w weterynarii i medycynie.