



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA BIOLOGIJU I EKOLOGIJU



mr Jelena Purać

**MOLEKULARNE OSNOVE OTPORNOSTI POLARNIH
INSEKATA NA NISKE TEMPERATURE**

-Doktorska disertacija-

Novi Sad, 2009.

Puno je ljudi i okolnosti bez kojih ova doktorska disertacija ne bi postojala, a najveću zahvalnost dugujem prof. dr Gordana Grubor-Lajšić. Pre svega zahvaljujem joj se na poverenju koje je imala u mene od samog početka pa do danas. Ona mi je omogućila da eksperimentalni deo ove teze uradim u Institutu «British Antarctic Survey» u Kembridžu u Velikoj Britaniji, gde sam provela dve godine. Zahvaljujem joj se na svemu što me je naučila, a i što mi je pružila priliku da naučim najsavremenije tehnike iz ove oblasti. Zahvaljujem joj se na profesionalnoj i privatnoj podršci koju mi je pružala. Njeno veliko znanje, iskustvo i predanos poslu su mi bili velika motivacija.

Ogromnu zahvalnost dugujem i svojim mentorima i saradnicima iz Kembridža, dr Melody Clark i dr Roger Worland, Gavin Burns i Michael Thorne. Dr Melody Clark je idejni tvorac i glavni mentor moje teze, jer je ona menadžer molekularne laboratorije u kojoj je odrađen najveći eksperimentalni deo ove disertacije. Ovom pilikom želim da joj se zahvalim što mi je pružila mogućnost da radim u njenoj laboratoriji kao i na svemu što me je naučila. Dr Roger Worland je moj drugi mentor, kom želim da se zahvalim na pomoći oko ekofiziologije insekata kao i na podršci koju mi je pružao tokom mog boravka u Kembridžu. Zahvaljujem se i Gavinu koji je radio sa mnom u laboratoriji, koji je uvek imao strpljenja za mene – što nije uvek bilo lako, na svemu što me je naučio. Michael-u, bioinformatičaru, na pomoći u obradi podataka i mukotrpnjoj analizi rezultata mikroereja. Takođe želim da se zahvalim što su mi prižili mogućnost odlaska na Arktik, radi sakupljanja eksperimentalnih životinja, što je iskustvo koje se teško može rečima opisati.

Želim da se zahvalim članovima komisije dr Branki Vasiljević i dr Dušku Blagojeviću na korisnim savetima tokom čitanja disertacije.

Dok sam ja radila doktorat u Engleskoj moje kolege, Danijela Kojić, Željko Popović, Elvira Pamer i Ana Blanuša iz laboratorije za biohemiju, su obavljali veliki deo mojih obaveza u Novom Sadu i ja im se ovom prilikom na tome zahvaljujem. Takođe im se zahvaljujem na lepoj i prijatnoj atmosferi u laboratoriji. Danijeli dugujem zahvalnost za pomoć i sugestije iz biohemije tokom pisanja teze.

Ogromnu zahvalnost dugujem svojoj porodici na ljubavi strpljenju i razumevanju. Oni su me u potpunosti podržavali i preuzeli veliki teret na sebe tokom izrade ove doktorske disertacije.

I konačno, ostaje mi da se zahvalim svom suprugu Milanu bez čijeg razumevanja i podrške nikada ovo ne bih uradila.

There are a significant number of people without whom this PhD dissertation would not exist. I most gratefully acknowledge my mentor Professor Dr Gordana Grubor-Lajšić. Above all and the most needed I'm grateful for the faith she had in me from the early stage of this work. She made it possible for me to perform the experimental part of this thesis at "British Antarctic Survey" Institute in Cambridge, United Kingdom, where I have spent two years. I'm grateful for all she has taught me and for giving me the unique opportunity to learn the latest techniques in this field. I'm thankful for both, her professional and personal support. Her immense knowledge, experience and professional dedication were exceptionally motivating.

Furthermore, I owe huge gratitude to my supervisors and associates in Cambridge, Dr Melody Clark, Dr Roger Worland, Gavin Burns and Michael Thorne. Dr Melody Clark is the idea maker and principle supervisor of my thesis, being the manager of the molecular laboratory in which the largest part of this dissertation was performed in. I would like to use this opportunity to express my gratitude for the privilege of working in her laboratory and for everything she taught me. I would also like to express my gratitude to Dr Roger Worland, my second supervisor. He helped me with insect ecophysiology and was continuously supportive throughout my stay in Cambridge. I'm thankful to Gavin who was working with me in the laboratory, for everything he taught me and for being immensely patient with me – that was difficult to endure at times. I'm also thankful to Michael, bioinformatician, for all the help on data analysis. In addition, I would like to thank them for providing me with the opportunity of visiting Arctic Circle in order to collect experimental animals. That experience remains difficult to be described in words.

I want to express my gratitude to members of the committee Dr Branka Vasiljević and Dr Duško Blagojević for their useful suggestions while reading the PhD thesis.

While I was working on my PhD in England, my colleagues Danijela Kojić, Željko Popović, Elvira Pamer and Ana Blanuša all covered a large part of my duties in Novi Sad and I'm thankful for that. In addition, I have to thank them for the pleasant and enjoyable atmosphere we have in our laboratory. I thank Danijela for her help and suggestions in the field of biochemistry during the creation of this thesis.

I owe immense gratitude to my family for their love, patience and understanding. They were fully supportive and provided me with continuous encouragement while this thesis was being created.

Lastly, I owe special thanks to my husband Milan. His understanding and inseparable support I have at all times. Without him, all this would not be possible.

SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
2. Opšti deo.....	4
2.1. Fiziološke i biohemijske osnove otpornosti insekata na niske temperature....	5
2.1.1. Nukleatori kristalizacije leda.....	8
2.1.2. Krioprotektanti.....	9
2.1.3. Antifriz proteini.....	10
2.1.4. Uloga vode u adaptaciji na niske temperature.....	11
2.1.5. Krioprotektivna dehidracija.....	12
2.1.6. Bimodalna distribucija i brza promena tačke superhlađenja.....	13
2.1.7. Vitifikacija.....	14
2.1.8. Primena kriobiologije insekata.....	15
2.2. Genomika i funkcionalna genomika – pregled i značaj.....	17
2.2.1. Genomika.....	17
2.2.2. Funkcionalna genomika.....	19
2.3. Sekvenciranje genoma insekata.....	23
2.4. Značaj funkcionalne genomike za razumevanje molekularnih mehanizama otpornosti insekata na niske temperature.....	25
3. Cilj istraživanja.....	34
4. Materijal i metode.....	36
4.1. Eksperimentalne životinje.....	37
4.2. Sakupljanje eksperimentalnih životinja i priprema za eksperiment.....	39
4.3. Izolovanje RNK i konstrukcija cDNK biblioteka.....	42
4.4. cDNK sekvenciranje.....	43
4.5. Analiza EST sekvenci.....	45
4.6. Štampanje mikroereja.....	47
4.7. Hibridizacija mikroereja.....	49
4.8. Analiza rezultata mikroereja.....	52
5. Rezultati.....	54
5.1. Rezultati analize EST sekvenci kod <i>Onychiurus arcticus</i>	55
5.2. Rezultati analize mikroereja kod <i>Onychiurus arcticus</i>	63
5.3. Rezultati analize EST sekvenci kod <i>Cryptopygus antarcticus</i>	69

5.4.	Rezultati analize mikroereja kod <i>Cryptopygus antarcticus</i>	72
6.	Diskusija	77
6.1.	<i>Onychiurus arcticus</i>	79
6.2.	<i>Cryptopygus antarcticus</i>	91
7.	Zaključci	94
8.	Literatura	99

LISTA SLIKA

Slika 1.	Levo: položaj Britanske arktičke istraživačke stanice. Desno: <i>O. arcticus</i> pod elektronskim mikroskopom na temperaturi od +4°C i u potpuno dehidratisanom stanju na temperaturi od -14°C.....	40
Slika 2.	Levo: položaj Istraživačke stanice Roteru na Antarktiku. Desno: <i>C. antarcticus</i> pod elektronskim mikroskopom.....	41
Slika 3.	Poravnanje tri translahirana potencijalna akvaporin gena kod <i>O. arcticus</i>	59
Slika 4.	Poravnanje translahiranog potencijalnog LEA gena kod <i>O. arcticus</i> i LEA proteina pirinča.....	61
Slika 5.	Šematski prikazana struktura akvaporina.....	83

LISTA TABELA

Tabela 1.	Transkripti i proteini čija je ekspesija povećana kod insekata kao odgovor na nisku temperaturu.....	26
Tabela 2.	Transkripti i proteini čija je ekspesija povećana kod raznih model organizama kao odgovor na nisku temperaturu.....	27
Tabela 3.	Pregled analize sekvenciranih cDNK klonova u svakoj od pet cDNK biblioteka kao i u svim bibliotekama zajedno kod <i>O. arcticus</i>	56
Tabela 4.	Broj klonova u cDNK bibliotekama koji imaju GO anotacije vezane za metabolizam trehaloze kod <i>O. arcticus</i>	58

Tabela 5.	Procenat aminokiselinske identičnosti između tri potencijalna akvaporina kod <i>O. arcticus</i>	60
Tabela 6.	Broj klonova u cDNK bibliotekama koji imaju GO anotacije vezane za antioksidativnu aktivnost kod <i>O. arcticus</i>	60
Tabela 7.	Prisustvo pojedinih EST klonova u različitim bibliotekama kod <i>O. arcticus</i>	62
Tabela 8.	Ukupan broj klonova čija je ekspresija statistički značajno povećana prilikom poređenja različitih tretmana međusobno, kao i tretmana i kontrole kod <i>O. arcticus</i>	63
Tabela 9.	Klonovi čija je ekspresija statistički značajno povećana u M2 tretmanu u poređenju sa kontrolnim eksperimentalnim životinjama, a koji su potencijalno uključeni u proces dehidracije kod <i>O. arcticus</i>	64
Tabela 10.	Klonovi čija je ekspresija statistički značajno povećana u M7 tretmanu u poređenju sa kontrolnim eksperimentalnim životinjama, a koji su potencijalno uključeni u proces dehidracije kod <i>O. arcticus</i>	65
Tabela 11.	Klonovi čija je ekspresija statistički značajno povećana u PD tretmanu u poređenju sa kontrolnim eksperimentalnim životinjama, a koji su potencijalno uključeni u proces dehidracije kod <i>O. arcticus</i>	66
Tabela 12.	Klonovi čija je ekspresija statistički značajno povećana u CD tretmanu u poređenju sa kontrolnim eksperimentalnim životinjama, a koji su potencijalno uključeni u proces dehidracije kod <i>O. arcticus</i>	66
Tabela 13.	Klonovi čija je ekspresija statistički značajno povećana u H18 tretmanu u poređenju sa kontrolnim eksperimentalnim životinjama, a koji su potencijalno uključeni u proces dehidracije kod <i>O. arcticus</i>	67
Tabela 14.	Statistički značajno povećanje ekspresije akvaporin gena prilikom poređenja različitih tretmana međusobno, kao i tretmana i kontrole kod <i>O. arcticus</i>	68
Tabela 15.	Pregled analize svih sekvenciranih cDNK klonova kao i seta cDNK klonova koji su naneti na mikroerej kod <i>C. antarcticus</i>	70
Tabela 16.	GO Slim analiza svih EST sekvenci kod <i>C. antarcticus</i>	71
Tabela 17.	Klonovi čija je ekspresija statistički značajno povećana u L grupi u poređenju sa kontrolnom grupom kod <i>C. antarcticus</i>	73
Tabela 18.	Klonovi čija je ekspresija statistički značajno povećana u H grupi u poređenju sa kontrolnom grupom kod <i>C. antarcticus</i>	74

Tabela 19.	Klonovi čija je ekspresija statistički značajno povećana u L grupi u poređenju sa H grupom kod <i>C. antarcticus</i>	75
Tabela 20.	Poređenje prisutnosti GO anotacija između različitih grupa kod <i>C. antarcticus</i>	76

LISTA ŠEMA

Šema 1.	Prikaz osnovnih biohemijskih jedinjenja koja se sintetišu kao odgovor na temperature ispod 0°C i njihova fiziološka uloga kod vrsta koje tolerišu tj. ne tolerišu zamrzavanje svojih telesnih tkiva.....	7
Šema 2.	Šematski prikazani odnosi između genomike, transkriptomike, proteomike i metabolomike.....	19
Šema 3.	Pregled metoda i redosled kojim su korišćene u radu.....	53
Šema 4.	Biohemijski put sinteze i razgradnje trehaloze do glukoze.....	81

1. Uvod

Utjecaj abiotičkih faktora spoljašnje sredine na preživljavanje, rast i razvoj organizama kao i razumevanje načina na koji organizmi odgovaraju na promene u spoljašnjoj sredini tokom kraćeg ili dužeg vremenskog perioda su od velikog značaja za evolucionu fiziologiju, ekologiju i konzervacionu biologiju.

Organizmi koji se tokom života suočavaju sa nepovoljnim uslovima sredine, koji često ugrožavaju i njihove osnovne životne funkcije, prelaze u stanje mirovanja, hipometabolizma, opstajući tako dok uslovi ne postanu povoljni za njihov dalji rast i razviće. Ulazak u hipometabolizam je obično povezan sa spoljašnjim faktorima, kao što su nedostatak hrane, niska ili visoka temperatura, nedostatak kiseonika ili vode, ili fotoperiod koji nagoveštava takve nepovoljne uslove. Tako je poznata pojava dijapauze kod insekata, hibernacije kod sisara ili estivacije kod sitnih kičmenjaka (Denlinger, 2002; Larade i Storey, 2002; Storey, 2003; Storey i Storey, 2004). Ovi fenomeni ograničeni su na kraći vremenski period. Sa druge strane, spore, semena biljaka ili ciste mogu da uđu u stanje kriptobioze koje karakteriše veoma niska stopa metabolizma (ametabolizam) (oko 5% od normalnog) (Keilin, 1959; Clegg, 2001) i podrazumeva velike promene unutar ćelije. Kriptobioza je povezana sa dehidratacijom ili anhidrobiozom i uključuje protektante koji stabilizuju biomolekule u periodu koji može da traje i duži niz godina (Clegg, 2001).

Posebno izražena sposobnost preživljavanja u nepovoljnim uslovima je prisutna kod zglavkara. Oni predstavljaju najmnogobrojniju i najrasprostranjeniju grupu životinja, naseljavaju sva vodena i suvozemna staništa, a često kolonizuju i staništa u kojima veoma malo drugih organizama može da preživi. Ovo je ilustrovano njihovim prisustvom u polarnim oblastima, gde žive na biološkoj granici života, u uslovima velike hladnoće. Mehanizmi koji im to omogućavaju su veoma kompleksni, a polarni insekti upravo predstavljaju prirodne modele za razumevanje ovih mehanizama. Na osnovu načina na koji preživljavaju temperature ispod 0°C insekte možemo podeliti u tri grupe (Bale, 1987; Sinclair, 1999; Zachariassen, 1985; Holmstrup i sar., 2002): *i*) insekti koji tolerišu vanćelijsko formiranje kristala leda, *ii*) insekti koji ne tolerišu zamrzavanje i moraju da ga izbegnu, a to čine superhlađenjem svojih telesnih tečnosti i *iii*) insekti koji preživljavaju zahvaljujući gubitku vode kroz permeabilnu kutikulu, što je nazvano krioprotektivna dehidratacija. Zanimljivo je da su ista biohemijska jedinjenja karakteristična za ove tri strategije: nukleotori kristalizacije leda, krio/anhidroprotektanti i antifriz proteini, ali se njihova fiziološka uloga razlikuje u različitim strategijama. Tokom poslednjih dvadeset godina puno se saznalo o ekofiziološkim

osnovama otpornosti insekata na niske temperature (Bale, 2002; Sinclair i sar., 2003b), međutim regulatorni putevi i kontrolni mehanizmi na nivou gena i proteina, su još uvek malo poznati. Genomske studije polarnih insekata su do danas bile ograničene uglavnom na analizu pojedinačnih gena, a malo se zna o njihovoj ukupnoj genomskoj konstituciji i transkriptomu. Ograničavajuća činjenica je i da je za samo mali broj organizama sekvenciran kompletan genom i da među njima nisu organizmi sa dobro razvijenom strategijom za preživljavanje ekstremno niskih temperatura.

Napredak u tehnikama funkcionalne genomike obezbedio je značajno oruđe u formi mikroereja koji omogućava istovremeno praćenje i poređenje ekspresije hiljade gena, a čija primena na polju insekatske kriobiologije će biti od ogromnog značaja.

Predmet ovih istraživanja je ispitivanje molekularne osnove otpornosti na niske temperature dve vrste polarnih kolembola *Onychiurus arcticus* sa Arktika i *Cryptopygus antarcticus* sa Antarktika, obuhvatajući fiziološki, biohemijski i molekularno biološki pristup. Ispitivane vrste izbegavaju zamrzavanje svojih telesnih tečnosti primenjujući različite strategije preživljavanje. Za vrstu *C. antarcticus* karakteristična je brza promena tačke superhlađenja, kao i njena bimodalna distribucija tokom leta, kada neke jedinke mrznu na višim (manje otporne na hladnoći), a druge na nižim (otpornije na hladnoću) temperaturama. Druga vrsta *O. arcticus* koristi strategiju preživljavanja zimskih temperature i do -25°C nazvanu krioprotektivna dehidracija. Na ovaj način, količina slobodne vode u telu se značajno redukuje, a akumulira se trehaloza kao krio/anhidroprotektant.

Pored ekofizioloških i biohemijskih istraživanja, ovaj rad je obuhvatio analizu transkriptoma ispitivanih vrsta u različitim eksperimentalnim uslovima. Dobijene EST sekvence u ovom radu su izuzetno značajne jer predstavljaju prve podatke u bazama podataka o genomima ove dve vrste, a analizom mikroerej rezultata dobijeni su značajno rezultati vezani za razumevanje molekularnih mehanizama otpornosti na niske temperature kod *Onychiurus arcticus* i *Cryptopygus antarcticus*.

2. Opšti deo

2.1. Fiziološke i biohemijske osnove otpornosti insekata na niske temperature

Kriobiologija insekata ili otpornost insekata na niske temperature je predmet proćavanja velikog broja studija, još od kada je Reaumur 1736. godine uoćio da neki insekti mogu da preživje zamrzavanje, a neki ne. Smatra se da je moderan pristup toj problematici dao Salt, koji je prvi detaljnije izućavao osnove ove otpornosti na biohemijskom i fiziološkom nivou (Salt, 1961a, 1969). Njegov rad otpoćeo je tridesetih godina i trajao sve do sedamdesetih godina prošlog veka, a osnovna pitanja i problemi koje je on postavio ostaju primarni fokus i današnjih istraživanja.

Mnogi insekti provode veliki deo svog života na niskim temperaturama, u uslovima koji bi bili letalni ili sprećili aktivnost mnogih vrsta iz tropskog ili umerenog klimata. Vrste koje naseljavaju polarne regione često prezimljavaju u mikrostaništima koja su zaštićana od najoštrijih temperatura (npr. unutar vegetacije ili ispod zemlje prekrivene snegom), ali i pored toga moraju da se izbore sa temperaturama ispod 0°C tokom znaćajnog perioda godine. Zbog toga imaju produžen životni ciklus koji im omogućava da stadijum imaga u kom su reproduktivno sposobni dostignu tokom kratkih letnjih perioda koji im omogućavaju rast i razvoj. To istovremeno znaći da moraju biti sposobni da prezime u različitim stadijumima razvića.

Da bi održali normalan metabolizam na niskim temperaturama insekti se susreću sa brojnim problemima, kao na primer održavanje neuralne funkcije, fluidnost ćelijske membrane, aktivnost enzima, adaptacije na gubitak vode koju gube njenom kristalizacijom, adaptacije na hipoksiju. Niske temperature mogu na različite načine da utiću na insekte i potrebno je napraviti razliku između efekata temperatura iznad i ispod 0°C. Na temperaturama ispod 0°C insekti se suoćavaju sa dva dodatna problema, oba vezana za vodu. Prvi je da je voda u spoljašnjoj sredini zarobljena u snegu i ledu i nedostupna organizmu što potencijalno dovodi do dehidracije, tako da je za mnoge ove organizme preživljavanje suše podjednako važno kao i preživljavanje niskih temperatura. Drugi problem je potencijalno zamrzavanje telesnih tećnosti insekata i suoćavanje sa fizićkim štetama koje nanose kristali leda.

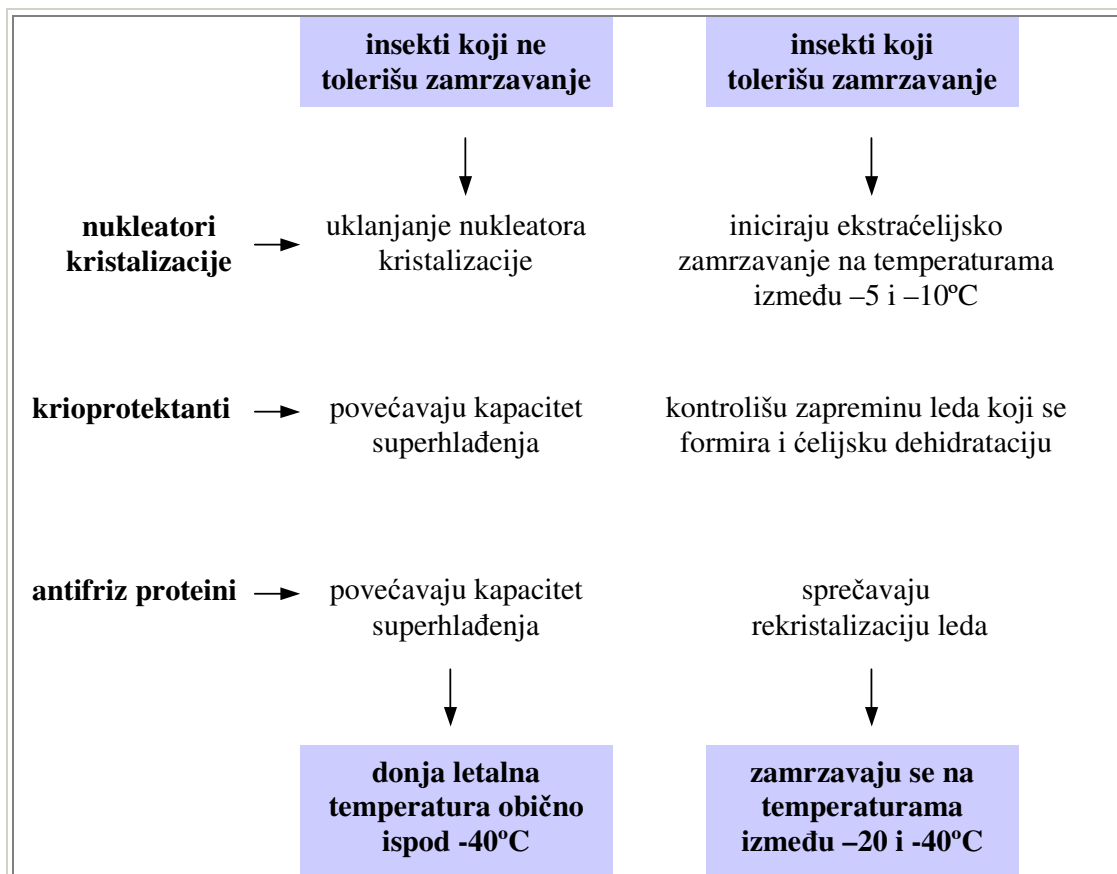
Poseban fenomen vezan za neke mehanizme koji omogućavaju insektima da prežive temperature ispod 0°C je superhlađenje. Insekti su superohlađeni ukoliko im se telesna temperatura spusti ispod aktuelne tačke mržnjenja, a da pri tome nije došlo do formiranja leda u tkivima. Ona temperatura na kojoj počinje da se formira led u superohlađenim telesnim tečnostima naziva se tačka superhlađenja/kristalizacije/nukleacije (Johnston i Lee, 1990; Zachariassen i sar., 1982) i može se detektovati merenjem oslobođene latentne toplote kristalizacije. Na osnovu načina na koji preživljavaju temperature ispod 0°C insekte možemo podeliti u tri grupe (Bale, 1987; Sinclair, 1999; Zachariassen, 1985; Holmstrup i sar., 2002):

1. insekti koji tolerišu vanćelijsko formiranje kristala leda,
2. insekti koji ne tolerišu zamrzavanje i moraju da ga izbegnu, a to čine superhlađenjem svojih telesnih tečnosti i
3. insekti koji snižavaju tačku superhlađenja, odžavajući pritisak vodene pare svojih telesnih tečnosti u ravnoteži sa pritiskom vodene pare okolnog leda – što je nazvano krioprotektivna dehidracija.

Nedostatak ove podele je što ne uzima u obzir stvarne efekte delovanja hladnoće, posebno one vezane za dužinu izlaganja superohlađenom stanju. Kod većine vrsta tačka superhlađenja predstavlja samo teorijski donju letalnu granicu, jer smrt nastupa usled kumulativnog efekta hladnoće pre nego što se dostigne ta temperatura. Da bi obuhvatio efekte hladnoće i zamrzavanja, kao i radi uključivanja vrsta iz svih klimatskih pojaseva, Bale (1996, 2002) je predložio da se grupa koju čine insekti koji ne tolerišu zamrzavanje dodatno podeli u četiri podgrupe:

- 2a. insekti koji ne tolerišu zamrzavanje u užem smislu – kod kojih smrtnost ne nastupa sve dok kristali leda ne počnu da se formiraju u telu
- 2b. insekti otporni na hladnoću – kod kojih smrtnost nastupa tek nakon dugog izlaganja (dani) temperaturama ispod 0°C a iznad tačke superhlađenja
- 2c. insekti osetljivi na hladnoću – kod kojih smrtnost nastupa nakog kratkog izlaganja (minuti, sati) temperaturama ispod 0°C a iznad tačke superhlađenja i
- 2d. insekti koji oportunistički preživljavaju – tj. oni koji nemaju nikakve mehanizme da se izbore sa niskim temperaturama i moraju po svaku cenu da ih izbegnu.

Zajednička odlika organizama sa različitim mehanizmima adaptacije na niske temperature je set biohemijskih jedinjenja čija se fiziološka funkcija razlikuje u zavisnosti da li organizam pripada grupi koja toleriše ili ne toleriše zamrzavanje (Šema 1.). To su nukleatori kristalizacije leda, krio/anhidroprotektanti i antifriz proteini. Tokom poslednjih dvadeset godina puno se saznalo o njihovoj sintezi i ulozi.



Šema 1. Prikaz osnovnih biohemijskih jedinjenja koja se sintetišu kao odgovor na temperature ispod 0°C i njihova fiziološka uloga kod vrsta koje tolerišu tj. ne tolerišu zamrzavanje svojih telesnih tkiva.

2.1.1. Nukleatori kristalizacije leda

Nukleacija može da bude homogena i heterogena. Pri homogenoj nukleaciji jedini molekuli pronađeni u kristalnom jezgru su molekuli vode, a pri heterogenoj postoje i drugi tipovi molekula, koji ubrzavaju nukleaciju, jer predstavljaju jezgra formiranja kristala leda. Ovi molekuli nazivaju se nukleatori kristalizacije leda.

Nukleatori kristalizacije leda, uglavnom nepoželjni, mogu biti bakterije (Strong-Gunderson i sar., 1989, 1990), ostaci hrane u digestivnom traktu, čestice zemlje ili led na spoljašnjoj površini kutikule (Sømme, 1982). Vrste koje tolerišu zamrzavanje naprotiv, često sintetišu nukleatore proteinske prirode koji se mogu naći u hemolimfi ili ćelijskom matriksu (Duman, 1982; Zachariassen i sar., 1982; Baust i Zachariassen, 1983; Duman i sar., 1991). Zato je Lundheim (1997) podelio nukleatore kristalizacije leda u dve kategorije: a) adaptivni – oni koji obezbeđuju organizmu prednost prilikom preživljavanja i b) slučajni – oni koji ne obezbeđuju organizmu nikakvu prednost.

Insekti koji ne tolerišu zamrzavanje imaju veliki kapacitet superhlađenja, koji nastaje kao posledica brojnih fizioloških promena, a ključni mehanizam je uklanjanje ili maskiranje nukleatora kristalizacije. U tom cilju prekida se uzimanje hrane, a digestivni sistem se čisti od ostataka hrane, čije čestice mogu da budu potencijalni nukleatori kristalizacije. Utvrđeno je da se pražnjenjem crevnog sistema tokom jeseni, kapacitet superhlađenja značajno povećava (Cannon and Block, 1988). Takođe, nukleatori kristalizacije koji se normalno nalaze u telu insekta, kao što su neke bakterije koje predstavljaju deo crevne flore (Lee i sar., 1993), se moraju eliminisati ili maskirati. Kod nekih vrsta samo na ovaj način se može omogućiti superhlađenje do ispod -20°C (Leather i sar., 1993).

Nasuprot prethodnoj grupi insekata, osnovni princip kod vrsta koje tolerišu zamrzavanje je da je ono naprotiv inicirano nukleatorima kristalizacije leda i to na što višim temperaturama. Treba naglasiti da se tolerantnost odnosi samo na formiranje leda u vanćelijskim prostorima i to do određene granice, a da je unutarćelijsko zamrzavanje letalno za organizam. Izuzetak je antarktička nematoda *Panagrolaimus davidi*, kod koje je dokazano da može da preživi unutarćelijsko zamrzavanje (Wharton i Ferns, 1995). Kod većine vrsta tolerantnih na zamrzavanje nukleatori kristalizacije se sintetišu u hemolimfi ili crevu tokom jeseni i početkom zime i iniciraju vanćelijsko zamrzavanje na temperaturama iznad -10°C . Formiranjem leda povećava se osmotski pritisak u vanćelijskom prostoru, što uzrokuje

dehidrataciju ćelije. Samim tim povećava se unutarćelijski osmotki pritisak, čime se smanjuje mogućnost formiranja kristala leda unutar ćelije. Kod nekoliko vrsta identifikovani su nukleatori kristalizacije proteinske prirode u hemolimfi ili ćelijskom matriksu (Duman i sar., 1995), a najbolje okarakterisan protein ove prirode je globularni 800 kDa lipoprotein izolovan iz hemolimfe *Tipula trivittata* (Duman i sar., 1985; Neven i sar., 1989).

2.1.2. Krioprotektanti

Jedna od najznačajnijih biohemijskih adaptacija za prezimljavanje kod insekata je sinteza i akumulacija organskih molekula male molekulske mase – krioprotektanata. Najčešći krioprotektanti su polihidroksilni alkoholi: glicerol, sorbitol, ribitol, eritritol, zatim disaharidi: trehaloza, saharoza, ili amino kiseline: alanin i prolin. Neki organizmi akumuliraju dve ili više vrsta krioprotektanata, a glicerol i sorbitol su česta kombinacija (Baust i Lee, 1981; Fields i sar., 1998; Storey i Storey, 1988). Ovi molekuli se akumuliraju u visokim koncentracijama, često 0,2-2 M, kao nivo glicerola u larvama osa *Bracon cephi* koji može da dostigne i do 5 M čineći do 25% telesne mase (Salt, 1961b).

Visoka koncentracija krioprotektanata koligativnim efektom snižava tačku mržnjenja. Organizmi koji ne tolerišu zamrzavanje na ovaj način povećavaju kapacitet superhlađenja i štite telesne tečnosti od zamrzavanja u okviru normalnih zimskih temperatura. (Duman i sar., 1995; Zachariassen, 1985).

Kod vrsta koje tolerišu zamrzavanje, najvažnija funkcija krioprotektanata je da kontrolišu zapreminu telesne vode koja se zamrzava. Naime, krioprotektanti povećavaju osmolarnost telesnih tečnosti snižavajući na taj način postotak vode u telu koja se može pretvoriti u ekstracelularni led. Kao posledica toga smanjuju ćelijsku dehidrataciju (Karow, 1991) i kontrolišu minimalnu zapreminu ćelije. U većini slučajeva gornja granica preživljavanja je oko 65% ukupne vode pretvorene u ekstracelularni led.

Krioprotektanti takođe imaju uticaj na makromolekule i ćelijske membrane. Smatra se da su ugljeni hidrati male molekulske mase odlični stabilizirajući agensi koji štite proteine i druge makromolekule od denaturacije tokom zamrzavanja i odmrzavanja (Carpenter i Crowe, 1988; Crowe i sar., 1984, 1987). Trehaloza i prolin imaju specifičnu funkciju u stabilizaciji strukture membranskog dvosloja, tako što direktno interaguju sa polarnim glavama membranskih

lipida. Oni se akumuliraju u nižoj koncentraciji, manjoj od 0,2 M. Njihovo delovanje se može detaljno objasniti u anhidrobiotskim sistemima (Crowe i sar., 1987) i potvrđeno je u studijama zamrzavanja izolovanih membrana (Rudolph i Crowe, 1985).

Trehaloza je neredukujući šećer, koji se sintetiše od glikogena (Avonce i sar., 2006) i smatra se da je to hormonski regulisano (Steele, 1961). Važno je da kao neredukujući šećer ona ne izaziva oštećenja u ćeliji čak ni pri visokim koncentracijama, kakve se javljaju prilikom dehidratacije. Trehaloza ima nisku tendenciju kristalizacije što je veoma bitno. Pored uloge da koligativnim efektom snižava tačku mržnjenja tako što se povećava kapacitet superhlađenja i štite telesne tečnosti od zamrzavanja u okviru normalnih zimskih temperatura (Duman i sar., 1995; Zachariassen, 1985), ona ima specifičnu funkciju u stabilizaciji strukture membranskog dvosloja, proteina i drugih makromolekula tokom dehidratacije, a smatra se da to ostvaruje formiranjem vodoničnih veza hidroksilnih grupa sa polarnim glavama membranskih lipida ili polarnim bočnim ostacima aminokiselina (Crowe i sar., 1987; Rudolph i Crowe, 1985). Ona efikasno sprečava i štetnu oksidaciju proteina i nezasićenih masnih kiselina u toku dehidratacije (Oku i sar., 2003).

2.1.3. Antifriz proteini

Antifriz proteini nekologativnim mehanizmom snižavaju tačku mržnjenja vode i to u prisustvu već formiranih kristala leda, ne utičući na tačku topljenja. Na ovaj način nastaje razlika između tačke mržnjenja i topljenja i to se naziva temperaturni histerezis (DeVries, 1986). Antifriz proteini su prvi put otkriveni u krvi antarktičkih riba (DeVries, 1971), a do danas su izolovani i analizirani kod velikog broja vrsta riba (Fletcher i sar., 2001), biljaka (Breton i sar., 2000), bakterija (Gilbert i sar., 2004), gljiva (Hoshino i sar., 2003) i artropoda, uključujući insekte (Duman, 1977; Duman i sar., 2004).

Do sada su najviše analizirani antifriz proteini riba i oni se na osnovu sekvence i strukturnih karakteristika mogu podeliti u 5 tipova, sa velikim brojem izoformi: antifriz proteini I – IV i antifriz glikoproteini (Brown i Sönnichsen, 2002).

Kod insekata su identifikovana tri tipa antifriz proteina, a svaki tip ima više izoformi. Najviše su proučavani antifriz proteini kod vrsta iz reda Coleoptera (tip Tm ili Dc) i kod vrste iz reda Lepidoptera (tip Cf). Oni imaju strukturu beta heliksa i sadrže regione bogate treoninom koji su odgovorni za vezivanje za kristale leda (Marshall i sar., 2002; Graether i sar., 2000),

međutim razlikuju se u primarnoj strukturi, heliksi im se uvrću na različite strane i imaju različit raspored disulfidnih veza (Graether i Sykes, 2004). Treći tip identifikovan je nedavno kod vrtse *Hypogastrura harveyi* iz reda Collembola. Za razliku od prethodna dva tipa kod kojih se smatra da se delovi bogati treoninom vezuju za kristal leda, ovde su to delovi bogati glicinom (Graham and Davies, 2005).

Teorija kojom se objašnjava fenomen temperaturnog histerezisa ima nekoliko alternativnih modela (Hall i Lips, 1999; Kristiansen i Zachariassen, 2005; Li i Luo, 1993, 1994), a najpoznatiji je tzv. mehanizam adsorpcione inhibicije (Raymond i DeVries, 1977, 1972). Prema ovoj teoriji antifriz proteini se adsorbuju na površinu kristala leda nakon čega njegov rast više nije energetski povoljan. Prema efektu Kelvina, za rast kristala leda temperatura mora da se snizi ispod tačke topljenja (Raymond i sar., 1989; Brown i Sönnichsen, 2002). Još uvek nije razjašnjeno da li su hidrofobne ili hidrofilne interakcije dominantne u ireverzibilnom vezivanju antifriz proteina za kristal leda (Jia i Davies 2002). Magnituda termalnog histerezisa zavisi od specifične aktivnosti i koncentracije antifriz proteina, a u nekim slučajevima i od prisustva drugih molekula koji pojačavaju njihove aktivnosti (Duman, 2001; Duman i Serianni, 2002).

Antifriz proteini su najčešće prisutni kod vrsta koje ne mogu da prežive zamrzavanje, jer povećavaju njihov kapacitet superhlađenja. Pored toga što inhibiraju rast malih kristala leda, smatra se da inhibiraju zamrzavanje inicirano ledom na spoljašnjoj površini kutikule (Olsen i sar., 1998) i maskiraju nukleatore kristalizacije u hemolimfi i digestivnom traktu (Olsen i Duman, 1997; Duman i sar., 2002).

Međutim, antifriz proteini su pronađeni i kod vrsta koje ne tolerišu zamrzavanje (Tursman i Duman, 1995; Duman, 2001), gde njihova uloga nije u potpunosti razjašnjena, ali se smatra da sprečavaju rekristalizaciju, rast i redistribuciju već formiranih kristala leda (Knight i sar., 1984).

2.1.4. Uloga vode u adaptaciji na niske temperature

Kao što je rečeno, na temperaturama ispod 0°C voda u spoljašnjoj sredini je zarobljena u snegu i ledu i tako nedostupna organizmu, što potencijalno dovodi do dehidracije. Hladan vazduh koji sadrži malo vlage dodatno isušuje organizme koji su njemu izloženi.

Voda je prisutna u organizmu u dve forme: 1) kao slobodna, osmotski aktivna voda koja može da se zamrzne i 2) kao osmotski neaktivna voda koja ne može da se zamrzne (ranije nazivana vezana voda) i ima važnu ulogu u preživljavanju insekata izloženim niskim temperaturama. Smatra se da je između 10% i 30% telesne vode insekata osmotski neaktivna voda (Block, 1996, 2002). Ova voda je deo bioloških struktura i važna je za održavanje tercijerne strukture biomolekula kao i strukture membrane.

Kako je voda nezaobilazan faktor svih modela otpornosti na niske temperature, dehidratacija je nezaobilazni deo istog adaptivnog mehanizma (Williams i sar., 2002; Ring i Danks, 1994). Tako, smanjenje zapremine telesne vode, što je utvrđeno kod različitih insekata tokom zime (Ring, 1982; Zachariassen, 1991), smanjuje mogućnost kristalizacije i opasnost od mehaničkih povreda kristalima leda, a istovremeno povećava relativnu koncentraciju krioprotektanata. Ovaj mehanizam otpornosti na niske temperature posebno je izražen kod pojedinih vrsta i predstavlja poseban adaptivni model nazvan krioprotektivna dehidratacija.

2.1.5. Krioprotektivna dehidratacija

Treći način na koji insekti preživljavaju temperature ispod 0°C nazvan je krioprotektivna dehidratacija, jer se zamrzavanje izbegava blagovremenim gubitkom vode, a adaptacije su usmerene na tolerisanje smanjenog prisustva vode (Worland, 1996; Holmstrup i Sømme, 1998; Worland i sar., 1998). Holmstrup (1992) je uočio da kokoni kišne gliste gube vodu usled razlike u pritisku vodene pare između superohlađenih telesnih tečnosti i okolnog leda što kao posledicu ima povećanu otpornost na hladnoću. Ova strategija je tada nazvana protektivna dehidratacija, a termin krioprotektivna dehidratacija je kasnije usvojen. Sposobnost da se tolerišu niske temperature u dehidratisanom stanju (gubitkom vode) je opisana kod većeg broja malih beskičmenjaka koji prezimljavaju u zamrznutom zemljištu i čiji je integument propustljiv za vodu, uključujući nematode, tartigrade, rakove i arktičku kolembolu *Onychiurus arcticus* (Worland i sar., 1998).

Letnja populacija *O. arcticus* ima srednju vrednost temperature superhlađenja od -6,1°C. Ova vrednost je relativno stabilna tokom leta i ukoliko se spoljašnja temperatura spusti ispod date temperature kolebole ne mogu da prežive (Block i sar., 1994). Činjenica da se temperatura zemljišta zimi spušta do oko -25°C sugeriše da mora da dođe do izvesnih promena u otpornosti na niske temperature da bi preživele. U eksperimentu u kom su kolebole *O.*

arcticus tokom tri nedelje hladene od 0°C do -5,5°C u prisustvu leda, sadržaj vode (osmotski aktivne vode) je snižen sa 70% na 40% sveže mase, a tačka superhlađenja se spustila sa -7°C na -17°C (Worland i sar., 1998). Pretpostavljeno je da se voda gubi iz superhlađenog insekta u okolni led jer je pritisak vodene pare okolnog leda niži od pritiska vodene pare telesnih tečnosti na istoj temperaturi. Na ovaj način insekti snižavaju tačku nukleacije, jer gubitak vode obezbeđuje da je koncentracija rastvorenih supstanci u telesnim tečnostima uvek dovoljno visoka da na datoj temperaturi spreči zamrzavanje (Holmstrup i Westh, 1994; Holmstrup i Zachariassen, 1996; Sømme and Birkemoe, 1997; Holmstrup i Sømme, 1998; Holmstrup i sar., 2002). Kada se uspostavi ravnoteža u pritiscima vodene pare, gubitak vode prestaje, a u tom momentu rizik od formiranja leda u tkivima je eliminisan i preživljavanje na temperaturama ispod nule je obezbeđeno.

Ne zna se pouzdano u kojoj meri insekti koriste ovu strategiju za preživljavanje niskih temperatura, ali smatra se da bi ona mogla da ima veći značaj, posebno kod vrsta koje su duži vremenski period izložene stabilnim temperaturama ispod 0°C i u kontaktu su sa ledom.

2.1.6. Bimodalna distribucija i brza promena tačke superhlađenja

Kod većine vrsta tačka superhlađenja se menja sezonski, viša je tokom letnjih meseci pri aktivnoj ishrani, rastu i reprodukciji, a niža tokom zimskog mirovanja (Cannon i Block, 1988). Kao što je opisano, sezonske promene tačke superhlađenja uključuju čitav niz fizioloških i biohemijskih procesa koji polako povećavaju sposobnost superhlađenja i omogućavaju preživljavanje na niskim temperaturama. Dobro poznati mehanizmi obuhvataju uklanjanje ili deaktivaciju nukleatora kristalizacije leda, akumulaciju krioprotektanata i proteina toplotnog stresa, a gubitak vode takođe igra veoma važnu ulogu.

Međutim neki zglavkari koji uspešno preživljavaju veoma niske zimske temperature, pored klasičnih sezonskih promena pokazuju bimodalnu distribuciju tačke superhlađenja i tokom letnjih meseci. To znači da tokom leta u populaciji postoje jedinke sa višom tačkom superhlađenja (manje otporne na hladnoću) kao i one sa nižom tačkom superhlađenja (otpornije na hladnoću) (Cannon, 1983; Schenker, 1984; Worland and Convey, 2001; Block, 1982; Block, 1984; Sinclair i sar., 2003a). Ovo je opisano kod nekoliko antarktičkih zglavkara (Worland and Convey, 2001). Na primer, antarktička kolembola *Cryptopygus antarcticus* je vrsta koja ne toleriše zamrzavanje i karakteriše je bimodalna distribucija tačke superhlađenja

tokom leta, gde jedna grupa mrzne na temperaturama između -6°C i -10°C , a druga između -18°C i -30°C (Sømme and Block, 1982; Worland and Convey, 2001). Takođe, poznato je da ove vrste mogu u veoma kratkom periodu, od jednog dana ili čak nekoliko časova da snize ili povećaju svoju tačku superhlađenja kao odgovor na uslove spoljašnje sredine (Worland i Convey, 2001). Smatra se da ovakva brza priprema za niske temperature može biti kritična za preživljavanje na Antarktiku, jer temperatura i tokom leta može veoma značajno da varira (Convey, 1997).

Postojanje bimodalne distribucije tačke superhlađenja tokom leta, kao i mehanizmi kojima se ona veoma brzo snižava ili povećava su dosta izučavani, ali samo delimično razjašnjeni i njihovo potpuno razumevanje i dalje predstavlja veliki izazov. Činjenica je da sposobnost brze promene tačke superhlađenja dovodi do stvaranja njene bimodalne distribucije u populaciji (Sømme, 1982; Sømme and Block, 1982), ali tačno objašnjenje ovog fenomena ostaje da se ispita. U tom cilju, u mnogim studijama analizirana je veza prisustva ili odsustva sadržaja creva sa tačkom superhlađenja, imajući u vidu prisustvo čestica hrane kao potencijalnih nukleatora kristalizacije (Sømme i Conradi-Larsen, 1977; Young i Block, 1980; Sømme, 1981; Block, 1982; Cannon, 1983; Cannon i Block, 1988; Rothery i Block, 1992). Predloženo je takođe da pojedine jedinke zadržavaju nisku tačku superhlađenja i tokom leta obezbeđujući na taj način preživljavanje na neočekivanim temperaturama ispod nule (Chown i Klok, 1998). Nedavno, uočen je uticaj presvlačenja na tačku superhlađenja (Worland, 2005; Worland i sar., 2006). Smatra se da presvlačenje može da snizi tačku superhlađenja kod kolembola, jer pre presvlačenja dolazi do potpunog pražnjenja creva (Thibaud, 1968). U ovom slučaju prisustvo jedinki sa niskom tačkom superhlađenja bio bi deo njihovog životnog ciklusa, a ne adaptacija na uslove spoljašnje sredine.

2.1.7. Vitifikacija

Vitifikacija je još jedan od mogućih mehanizama preživljavanja insekata na temperaturama ispod 0°C . To je fizički proces u kom tečnost, ukoliko se hladi dovoljno brzo, prelazi u čvrsto stakleno stanje, bez stvaranja ledenih kristala koji potencijalno dovode do mehaničkih oštećenja. Potrebna brzina hlađenja je izuzetno visoka za čiste tečnosti, ali je realnija za rastvore, npr. za vodeni rastvor tipičnih krioprotektanata potrebna je brzina hlađenja od $0,1-10^{\circ}\text{C}$ u sekundi. Tokom tako brzog hlađenja molekuli nemaju vremena da se organizuju u kristalne strukture.

Wasylyk i sar. (1988) su uočili parcijalno formiranje staklene faze u preparatima hemolimfe larve *E.solidaginis*. Smatra se da hemolimfa nekih insekata može biti vitrifikovana pri brzinama hlađenja koje postoje u prirodi i da to predstavlja dobru strategiju za preživljavanje niskih temperatura, ali direktnih dokaza za to nema.

2.1.8. Primena kriobiologije insekata

Interesovanje za kriobiologiju insekata je značajno poraslo poslednjih godina, jer bolje razumevanje mehanizama kojim živa bića odolevaju niskim temperaturama i niskom sadržaju vode, kao i analiza oštećenja nastalih kao posledica izlaganja ovakvim uslovima imaju veliku potencijalnu primenu u različitim poljima.

Jedna od najvažnijih primena je čuvanje biološkog materijala humanog, animalnog i biljnog porekla van bioloških sistema. Cilj je da se žive ćelije i cilju očuvanja izlože niskim temperaturama, a da se sačuva morfološka struktura i funkcionalnost ćelija, tkiva ili organa. Za kvalitet i kvantitet materijala koji se čuva od presudnog značaja su uslovi pod kojima se obavlja zamrzavanje. Krioprezervacija se koristi u medicini za čuvanje matičnih ćelija hematopoeze, polnih ćelija, ćelija krvi, kao i tkiva i organa za transplantaciju. U veterini, za čuvanje oplodnog materijala za veštačko osemenjavanje, a u agronomiji za bezbedno i dugotrajno čuvanje semenskog materijala. Putem zamrzavanja polnih ćelija ili embriona, moguće je očuvanje genetskog materijala ugroženih vrsta biljaka i životinja i biološkog diverziteta. Takođe, sušenje i zamrzavanje imaju veliku primenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.

U poljoprivredi, bolje razumevanje strategije kojom pojedini štetni insekti prezimljavaju, može se iskoristiti u borbi protiv njih. Bakterije i gljive koje deluju kao inicijatori kristalizacije mogu da se koriste da smanje sposobnost superhlađenja štetnih insekata koji ne tole tišu zamrzavanje i da se na taj način biološki kontrolišu ove vrste (Lee i sar., 1998). Dodatno, brojnost populacija pojedinih štetnih insekata se može predvideti na osnovu jačine i dužine trajanja zime (Werker i sar., 1998), a moguće je predvideti naseljavanje potencijalnih invazivnih, ne-nativnih vrsta u nova okruženja (Bale i Walters, 2001).

Veoma je važna i potencijalna uloga u predviđanju i razumevanju efekata globalnih klimatskih promena. Uticaj klimatskih promena na insekte je veoma kompleksan jer uključuje

kombinaciju više abiotičkih faktora (temperatura, CO₂, padavine) koji ne moraju da deluju zajedno i koji mogu da imaju različit direktan ili indirektan efekat na insekte. U analizu bi trebalo uključiti i mesto insekata u lancima ishrane imajući u vidu i prirodne neprijatelje vrsta koje posmatramo (Bale i sar., 2002; Bale, 2002).

I konačno, kriobiologija insekata leži na pragu novih primena, jer će u bliskoj budućnosti, kada se u potpunosti razjasne molekularne strukture nukleatora kristalizacije i antifriz proteina, oni putem transgene tehnologije biti iskorišćeni kod drugih taksonomskih grupa i za čitav niz novih primena čije je granice u ovom momentu nemoguće zamisliti (Duman, 2001, Bale, 2002).

2.2. Genomika i funkcionalna genomika – pregled i značaj

Dvadeseti vek može se nazvati "vek gena" (Waldby, 2001). Tri naučnika 1900. godine, Hugo de Vries (Holandija), Carl Correns (Nemačka) i Erich Tschermak (Austrija), nezavisno jedan od drugog, slučajno otkrivaju zakone o nasleđivanju koje je Gregor Mendel formulisao 40-tak godina ranije, a 1901. godine pojavljuje se prvi prevod Mendelovih radova na engleski jezik u magazinu "Journal of the Royal Horticultural Society". William Bateson je 1902. godine predložio da se nova oblast biologije nazove GENETIKA, Wilhelm Ludvig Johannsen 1909. godine uvodi termin GEN, a botaničar Hans Winkler 1920. godine uvodi termin GENOM. Termin GENOMIKA se pojavio tek sredinom 80-tih godina, kada je 1987. godine genetičar Thomas Roderick tim terminom opisao pristup proučavanju DNK na nivou hromozoma, celih genoma ili velikih grupa gena, a tako je nazvan i novi časopis (izdavač Elsevier Inc., McKusick i Ruddle, 1987). Vek se završio revolucijom u genomici i saopštenjem da je dobijena prva verzija sekvence humanog genoma, juna 2000. godine.

2.2.1. Genomika

Genomika izučava strukturu i organizaciju genoma tj. kompletnog hromozomskog seta nekog organizma, za razliku od klasične genetike koja analizira pojedinačne gene, njihovu funkciju i ulogu. Bazira se na zapažanju da se uticaj jednog gena na fenotip može razumeti samo u kontekstu ekspresije nekoliko drugih gena ili konačno, svih gena u genomu.

U ovom trenutku takva istraživanja podrazumevaju kreiranje i upotrebu velikih baza podataka, laboratorijsku opremu visoke tehnologije, a samim tim i velika ulaganja u ta istraživanja. Genomika se u najvećoj meri oslanja na sekvenciranje genoma različitih organizama i doživljava procvat 90-tih godina, kada su počeli projekti sekvenciranja nekoliko bioloških vrsta. Razvoj biotehnologije i računarske tehnologije značajno je doprineo razvoju genomike. Model organizmi čiji su genomi sekvencirani i za koje postoje velike baze podataka dostupne svima na internetu su: *Escherichia coli*, *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana*, *Danio rerio*, *Mus musculus* i drugi.

Kao godina početka razvoja genomike uzima se 1995., kada je prvi put u potpunosti sekvenciran genom slobodnog živog organizma i to genom bakterije *Haemophilus influenzae*, iako je nekoliko godina ranije sekvenciran genom bakteriofaga Φ -X174. Nakon toga tehnologija sekvenciranja je brzo napredovala i genomi su sekvencirani velikom brzinom.

Prvi eukariotski genom sekvenciran je 1996. godine i to je bio kvasac, *Saccharomyces cerevisiae*, a 1998. je prvi put pročitani multicelularni eukariotski genom crva *Caenorhabditis elegans*.

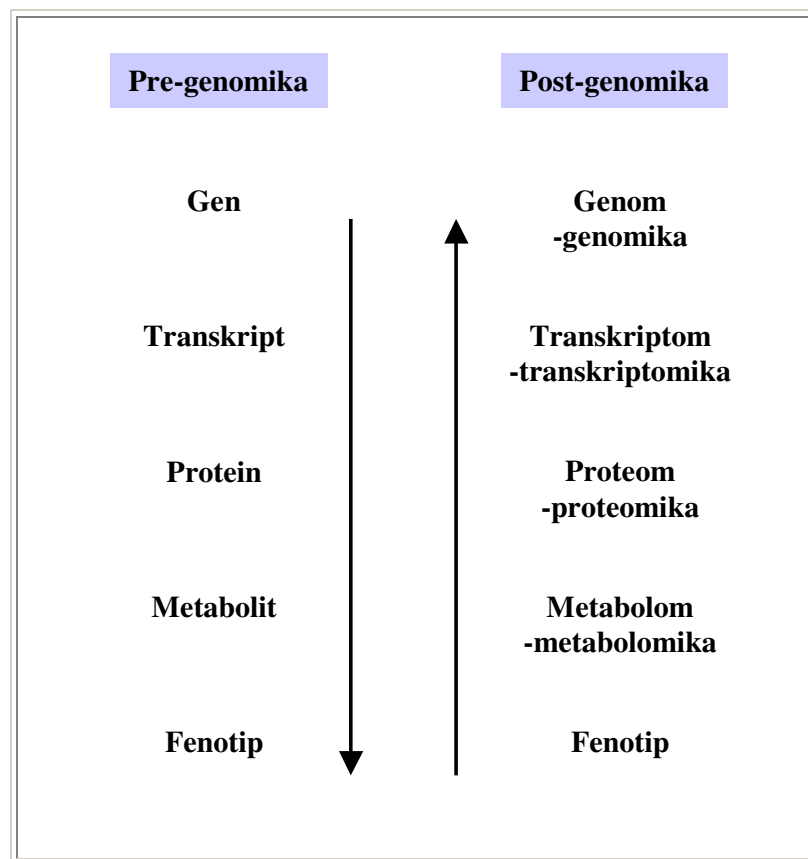
Projekat sekvenciranja humanog genoma je iniciran u SAD od strane Nacionalnog zdravstvenog instituta (eng. *National Institutes of Health - NIH*) i Ministarstva za energiju. Pokrenut je krajem 1990. godine i u njemu je učestvovalo nekoliko instituta širom sveta (Sanger institut - UK, Whitehead centar SAD, RIKEN centar - Japan, Maks Plank Institut - Nemačka i drugi manji centri u SAD, Nemačkoj, Francuskoj, Kanadi, Kini i Japanu). Projekat Humani genom (eng. *Human Genom Project - HGP*) imao je za cilj sekvenciranje kompletnog ljudskog genoma (oko 3 milijarde bp) do 2005. godine, uz formiranje javnih baza podataka. U međuvremenu, 1998. godine, privatna firma Celera Genomics se uključila u trku i postava sebi za cilj sekvenciranje humanog genoma do 2001. godine. Istraživači državnog projekta Humani genom i Celere koristili su različite strategije u radu, kako tokom prikupljanja uzoraka tako i u postupku sekvenciranja. Trka je završena zajedničkom konferencijom za štampu, juna 2000. godine, na kojoj je objavljeno da je dobijena prva verzija sekvence humanog genoma, a rezultati su objavljeni sa razlikom od jednog dana u časopisima "Nature" i "Science" u februaru 2001. godine. Projekat Humani genom okončan je aprila 2003. godine, sa 99% sekvenciranog genoma i greškom od 0.01%. Ovo se smatra jednim od najuspešnijih naučnih poduhvata u istoriji.

Do decembra 2007. godine, prema podacima američkog Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (eng. *National Center for Biotechnology Information - NCBI*) u potpunosti je sekvencirano 636 genoma, najviše prokariota zbog male veličine genoma. Delimična sekvenca bila je poznata za 513 genoma, a još 686 genomskih projekata je bilo u toku (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/gpstat.html>). Ove brojke se uvećavaju svakog meseca.

Najčešće se genomika deli na strukturnu, funkcionalnu i komparativnu. Strukturna genomika predstavlja početnu fazu genomskih istraživanja - sekvenciranje DNK, lokalizaciju i konstrukciju genskih mapa. Funkcionalna genomika analizira biološku funkciju gena, produkte gena i regulaciju genske ekspresije, a komparativna genomika poredi gene i proteine različitih genoma sa ciljem da se utvrdi funkcionalna i evolutivna veza između njih.

2.2.2. Funkcionalna genomika

Brz razvoj genomike i ogromna finansijska sredstava uložena u nju ubrzao je razvoj post-genomskih tehnologija. Bliske grane nauke su usvojile slične termine, a internet strana <http://www.genomicglossaries.com/>. sadrži 60 naziva koji se završavaju na "-omika" od kojih neki imaju više, a neki manje smisla. Tri najčešća termina su transkriptomika, proteomika i metabolomika (Šema 2.) Šire gledano, sva ova istraživanja spadaju u domen funkcionalne genomike, jer se ne analizira DNK kao takva, već njena funkcija.



Šema 2. Šematski prikazani odnosi između genomike, transkriptomike, proteomike i metabolomike. Osnovni smer istraživanja pre razvoja genomike je bio od pojedinačnog gena ka njegovom fenotipskom efektu, a nakon razvoja genomike suprotan, od fenotipa ka genomu.

Transkriptomika

Transkriptomika se bavi analizom čitavog transkriptoma u ćeliji u određenom momentu što uključuje iRNK, rRNK, tRNK i male RNK. Međutim, u praksi se to uglavnom ograničava na iRNK koja predstavlja matricu za sintezu proteina. Osnovni cilj u transkriptomici je da se dobije profil globalne genske ekspresije u nekoj eksperimentalnoj grupi od interesa i da se on uporedi sa ekspresijom gena u kontrolnoj grupi. Transkriptomika nam može dati odgovore na pitanja tipa: koji geni su isključeni ili uključeni tokom izvesnih faza ćelijskog ciklusa, koji geni menjaju svoju ekspresiju kao adaptacija na okolinu ili tokom izvesnih fizioloških stanja. Generalno, očekuje se mnogo više transkripata nego protein kodirajućih gena, zbog alternativnog splajsovanja hnRNK (dobijanje različitih iRNK od jedne hnRNK tokom uklanjanja introna), i RNK editovanja (posttranskripciono dodavanje ili delecija nukleotida ili konverzija baza). Obzirom da sve ćelije jednog organizma imaju isti genom, a različit transkriptom, a čak i ukoliko posmatramo ćelije istog tipa njihov transkriptom se razlikuje u zavisnosti od uslova spoljašnje sredine, fiziološkog stanja, faze razvića itd., smatra se da analiza transkriptoma omogaćava bolje razumevanje žive ćelije od analize genoma.

Nekoliko tehnika se danas koristi u transkriptomici za analizu genske ekspresije na globalnom nivou i identifikacije diferencijalno eksprimiranih gena. Tehnike kao što su *differential display* i AFLP (eng. *Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism*) su pristupačne većini laboratorija i dokazano su korisne. Metode koje se baziraju na sekvenciranju, kao što su SAGE (eng. *Serial Analysis of Gene Expression*) i MPSS (eng. *Massively Parallel Signature Sequencing*) takođe koriste činjenicu da će one iRNK koje se više ekspresuju biti više zastupljene i u cDNK bibliotekama. Ove metode omogućavaju uporednu analizu hiljade transkripata, generišući kratke nukleotidne sekvence koje su specifične za date iRNK. Najveću primenu u transkriptomici ima mikroerej tehnika koja je razvijena sredinom devedesetih godina.

Proteomika

Transkripti nemaju sposobnost da obezbede fiziološki odgovor, ta funkcija je rezervisana za proteine, a oni se analiziraju tehnikama proteomike. Osnovni cilj proteomike je identifikacija proteina u ćeliji, tkivu, organu ili čitavom organizmu u datom trenutku, pod određenim eksperimentalnim uslovima i analiza njihovih interakcija. Naziv proteom nastao je 1994.

godine kada ga je Mark Willkins doktorant na Univerzitetu u Sidneju prvi put upotrebio da bi opisao skup svih ljudskih proteina. Kao i genomika, proteomika je nastala zahvaljujući tehnološkim inovacijama pre svega vezanim za masenu spektrometriju. Proteomika pruža drugačiju sliku ćelijske aktivnosti od analize transkriptoma i po mnogima, ona daje potpuniji uvid u funkcionalnost biološkog sistema jer proteini predstavljaju glavne komponente fizioloških puteva ćelije. Mnogi autori su ukazali na nedostatak korelacije između iRNK i prisutnosti proteina tj. da nivo transkripcije gena daje samo grubu procenu nivoa njihove ekspresije u proteine. Takođe ne postoji korelacija između broja gena i broja različitih iRNK. Poređenja radi, humani genom čini oko 30 000 gena, a ukupan broj različitih proteina u ljudskom organizmu je procenjen na >300 000 (prema nekim procenama >500 000). Razlozi za ovo su višestruki. Kao što je rečeno, zbog alternativnog splajsovanja i RNK editovanja mnogi geni daju više različitih iRNK. Zatim, nastale iRNK imaju različitu stabilnost i efikasnost translacije. Translaciona kontrola omogućava da ćelija izabere samo neke iRNK za translaciju, a blokira ostale, a ta selekcija često zavisi od uslova u okruženju. Takođe, novosintetisani proteini se značajno razlikuju u stabilnosti i poluživotu. Mnogi proteini imaju vrlo kratak poluživot, što je i karakteristika njihove regulatorne uloge u procesima kao što su signalna transdukcija ili kontrola ćelijskog ciklusa. S druge strane, aktivnost i funkcija proteina je često rezultat posttranslacionih modifikacija (glikozilacija, fosforilacija, acetilacija, deaminacija, ubikvitinacija) i drugih promena pod uticajem raznih agenasa u okruženju. Konačno, mnogi proteini formiraju komplekse sa drugim proteinima ili RNK molekulima, i jedino su funkcionalni u prisustvu drugih molekula. Proteom, transkriptom i genom su povezani višestrukim povratnim mehanizmima. Neki proteini na primer, imaju ulogu transkripcionih faktora potrebnih za aktivaciju gena, neki su enzimi uključeni u procese transkripcije i translacije, a neki su strukturne komponente hromozoma - tako da u molekularno biološkom kontekstu, živa ćelija se može razumeti samo analizom genoma, transkriptoma i proteoma zajedno.

Od metoda za separaciju proteina najčešće se koristi dvodimenzionalna elektroforeza (2-D-SDS-PAGE), ali i druge analitičke tehnike su vrlo važne, kao npr. jednodimenzionalna elektroforeza (SDS-PAGE), kapilarna elektroforeza (CE), izoelektrično fokusiranje (IEF), tečna hromatografija visokih performansi (HPLC) i afinitivna hromatografija. Dva osnovna tipa masenog spektrometra koja se koriste u proteomici su: MALDI-TOF sistem i tandemski ESI-MS-MS sistem. Prvim sistemom se određuje masa peptida, a drugim i sekvenca peptida i modifikacija specifičnih amino kiselina u okviru peptida.

Metabolomika

Termin metabolomika se koristi za tehnike kojima se analizira kompletan biohemijski fenotip u cilju razumevanja metabolizma nekog organizma. Metabolomika se bavi analizom metaboloma, svih metabolita niske molekulske mase (obično <1000 Da) koji nastaju kao rezultat specifičnih ćelijskih procesa. Tu spadaju amino kiseline, ugljeni hidrati, lipidi, peptidi, purini, pirimidini, vitamini, hormoni, signalni molekuli i razni drugi primarni i sekundarni metaboliti. Kao i transkriptom i proteom, metabolom je dinamička kategorija, a promene se dešavaju iz sekunde u sekundu, kako u jednoj ćeliji, tako i između ćelija viševićijskog organizma. Zato nam metabolomika, za razliku od transkriptomike i proteomike daje potpuni uvid u fiziologiju ćelije. Termin metabonomika se često koristi u istom značenju kao i metabolomika. Iako postoje nesuglasice, sve više je prihvaćena definicija, da za razliku od metabolomike koja ima za cilj da karakterizuje i kvantifikuje veliki broj malih molekula koji se nalaze u organizmu u različitim uslovima, metabonomika proučava kako se metabolički profil kompleksnog biološkog sistema menja prilikom odgovora na tretman određenim lekovima, tokom bolesti, promenom ishrane, izlaganju toksičnim hemikalijama i sl. (Lindon i sar., 2004). U januaru 2007. godine, naučnici Univerziteta u Alberti i Kalgariju su objavili analizu humanog metaboloma i dali listu od 2500 metabolita, 1200 lekova i 3500 komponenti hrane koje se mogu naći u njegovom sastavu (Wishart i sar., 2008).

Analiza metaboloma zahteva različite analitičke metode da bi se dobila kompletna slika, jer se radi o velikom broju jedinjenja sa različitim hemijskim osobinama (hidrofilna nasuprot hidrofobnim, kisela nasuprot baznim, reaktivna nasuprot inertnim...). Obično su samo metaboliti koji pripadaju ograničenoj kategoriji uključeni u analizu. Od metoda za separaciju molekula najčešće se koriste gasna hromatografija (GC), tečna hromatografija visokih performansi (HPLC) i kapilarna elektroforeza (CE), a od metoda za detekciju to su masena spektroskopija (MS), koja se najčešće koristi u kombinaciji sa gasnom hromatografijom (GC-MS) i nuklearna magnetna rezonantna spektroskopija (NMR).

Bioinformatika

Podaci koji se generišu u genomici, transkriptomici, proteomici i metabolomici su izuzetno obimni, analiza tih podataka se razvila u posebnu nauku bioinformatiku. Bioinformatika je multidisciplinarna oblast koja uključuje primenu matematike, informatike, statistike, biologije i hemije u cilju rešavanja bioloških problema na molekularnom nivou.

2.3. Sekvenciranje genoma insekata

Veliki medicinski, ekonomski i ekološki značaj insekata opravdao je mnogobrojne projekte sekvenciranja genoma velikog broja vrsta. Prema podacima na NCBI internet stranici iz avgusta 2008. godine, u bazi genomskih projekata se mogla dobiti informacija o genomima 38 vrsta insekata, od kojih je genom *Drosophila melanogaster* u potpunosti sekvenciran, za 20 vrsta je dostupna nekompletna sekvenca, a 17 genoma je bilo u procesu sekvenciranja (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/gpstat.html>). Ovih 38 vrsta pripada različitim redovima, a među njima ima predstavnika holometabolnog i hemimetabolnog razvića. Zna se da su genomi još nekoliko vrsta sekvencirani, međutim te sekvence nisu dostupne u javnim bazama podataka.

Prvi sekvencirani genom insekata je bio genom vinske mušice *Drosophila melanogaster* (Adams i sar., 2000). Ovaj genom je odabran jer vinska mušica ima dugu istoriju kao model organizam u genetičkim istraživanjima i biologiji razvića, kao i ogroman značaj u razumevanju fundamentalnih bioloških mehanizama (Nobelova nagrada za fiziologiju i medicinu, 1995). Od tada, genomi 22 vrste roda *Drosophila* su sekvencirani ili su u procesu sekvenciranja. Sve dobijene informacije nadopunjuju jedna drugu, pomažu u boljoj interpretaciji genomskih podataka dobijenih za vrstu *Drosophila melanogaster*, omogućuju razumevanje razlika u genomu koje nastaju mutacijama ili evolucijom unutar ili između vrsta kao i studije populacione genomike. Osim genoma vrsta roda *Drosophila*, još tri genoma reda Diptera su sekvencirana: malarični komarac *Anopheles gambiae*, komarac žute groznice *Aedes aegypti* i obični komarac *Culex quinquefasciatus*.

Iz reda Lepidoptera analiziran je genom nekoliko holometabolnih insekatskih vrsta od ekonomskog i agronomskog značaja. Tako je sekvenciran genom svilene bube *Bombyx mori*, prvenstveno zbog njenog značaja u tekstilnoj industriji zbog čega se i koristila kao model organizam za razne mikrobiološke, fiziološke i genetičke analize od početka 19. veka. U toku je sekvenciranje genoma leptira *Bicyclus anynana* i *Melitaea cinxia* koji su odabrani kao modeli jer mogu da pruže odgovore na brojna pitanja iz ekologije, evolucije i genetike razvića.

Genomi četiri vrste reda Hymenoptera su takođe sekvencirani ili su u procesu sekvenciranja. Medonosna pčela, *Apis mellifera* i tri vrste parazitske ose roda *Nasonia* koje predstavljaju prirodne neprijatelje mnogih zglavkara, uključujući štetočine u poljoprivredi, što je favorizovalo njihovu selekciju za sekvenciranje.

Iz reda Coleoptera, poznata je sekvenca genoma brašnenog moljca, *Tribolium castaneum*, koji ima holometabolno razviće.

Iz redova Hemiptera i Phthiraptera završeno je ili je u toku sekvenciranje genoma četiri hemimetabolne vrste: i) graškova zelena vaš, *Acyrtosiphon pisum* koja napada grašak i detelinu, nanosi veliku štetu farmerima i prehrambenoj industriji, ii) stenica, *Rhodnius prolixus*, koja prenosi parazit *Trypanosoma cruzi* koji izaziva Šagasovu bolest, iii) ljudska vaš, *Pediculus humanus corporis*, koja kao prenosilac raznih bolesti ima veliki značaj u medicini i iv) *Diaphorina citri*, štetočina koja napada citruse, veoma široko rasprostranjena u južnoj Aziji i drugim regionima. Očekuje se da će ova lista da se povećava jer ove genomske informacije imaju veliku primenu i pružaju odgovor na mnoga biološka pitanja.

2.4. Značaj funkcionalne genomike za razumevanje molekularnih mehanizama otpornosti insekata na niske temperature

I pored toga što se dosta zna o biohemijskim i fiziološkim mehanizmima otpornosti insekata na niske temperature, molekularni mehanizmi koji se nalaze u osnovi ovih adaptacija su nedovoljno istraženi, a identifikacija gena i proteina uključenih u ovaj fenomen predstavlja veliki izazov.

Nove tehnologije u genomici, proteomici i metabolomici su našle svoje mesto i u boljem razumevanju adaptacije organizma na promene u spoljašnjoj sredini. Transkripcioni profil se pokazao kao jedan od najatraktivnijih pristupa funkcionalne genomike. Primena DNK mikroereja trenutno obezbeđuje najefikasniji način da se definišu geni čiji povećan ili smanjen nivo ekspresije odražava odgovor na određene eksperimentalne uslove. Ova tehnika omogućava i identifikaciju novih gena, a samim tim obezbeđuje bolje razumevanje biohemijskih puteva i ćelijske signalizacije. Kod insekata, mikroerej tehnika je do sada uglavnom primenjivana kod model organizama, *D. melanogaster*, *A. gambiae*, *A. aegypti* i *B. mori* koji imaju sekvenciran genom. Na žalost ovo znanje nije uvek direktno primenljivo na druge vrste. To je slučaj sa analizom otpornosti na niske temperature, jer navedene vrste žive u toplijim krajevima i ne mogu da prežive izlaganja ekstremno niskim temperaturama. Međutim, napredak u molekularno biološkim tehnikama omogućio je primenu mikroerej tehnike i na ne-model organizme kod kojih nije poznata DNK sekvenca (Oleksiak i sar., 2001; Blaxter, 2002; Renn i sar., 2004). Mikroerej se može konstruisati po relativno pristupačnoj ceni za male istraživačke grupe, ako se ograniči na određene gene povezane sa specifičnom funkcijom ili određenim odgovorom. Da bi se identifikovali molekularni mehanizmi potreban je skup većeg broja gena iz datog organizma (Parkinson i sar., 2004). Najefikasniji način je da se izoluje RNK i konstruišu kompleman tarne cDNK biblioteke. Nakon toga se cDNK klonovi sekvenciraju (EST sekvence) i koriste za konstrukciju cDNK mikroereja (Adams i sar., 1993; Marra i sar., 1999; Boardman i sar., 2002).

Do sada je identifikovan veliki broj transkripata i proteina čija se ekspresija povećava kod insekata i raznih drugih model organizama prilikom izlaganja niskim temperaturama. Neki od njih nalaze se u Tabeli 1. i u Tabeli 2. (Michaud i Denlinger, 2004).

Tabela 1. Transkripti i proteini čija je ekspresija povećana kod insekata kao odgovor na nisku temperaturu.

Gen	Vrsta	Komentar
Hsp70	<i>Drosophila</i> (4 vrste)	povećana ekspresija tokom oporavka nakon izlaganja niskoj temperaturi
Hsp70	<i>Sarcophaga crassipalpis</i> , <i>Leptinotarsa decemlineata</i>	povećana ekspresija tokom dijapauze i oporavka nakon izlaganja niskoj temp.
Hsc70	<i>S. crassipalpis</i>	povećana ekspresija tokom dijapauze i oporavka nakon izlaganja niskoj temp.
Hsp23	<i>S. crassipalpis</i>	povećana ekspresija tokom dijapauze i oporavka nakon izlaganja niskoj temp.
Hsp90	<i>S. crassipalpis</i>	povećana ekspresija tokom oporavka nakon izlaganja niskoj temperaturi
Dca	<i>D. melanogaster</i>	povećana ekspresija tokom izlaganja temperaturi od 15°C
Fst	<i>D. melanogaster</i>	povećana ekspresija tokom oporavka nakon izlaganja temperaturi od 0°C
Hsr-omega	<i>Drosophila</i> (3 vrste)	indukcija 93 kDa proteina toplotnog stresa nakon hladnog šoka
Svp	<i>Bombyx mori</i>	transkripcioni factor čija je ekspresija povećana nakon hlađenja
Sorbitol dehidrogenaza	<i>B. mori</i>	povećana ekspresija nakon hlađenja u periodu od 50 dana
Samui	<i>B. mori</i>	protein indukovan hladnoćom koji učestvuje u transdukciji signala
c-fos-sličan	<i>Galleria mellonella</i>	indukcija u mozgu nakon izlaganja temperaturi 0°C u periodu od 3h
Cp1, Cp2	<i>Spodoptera exigua</i>	protein indukovan nakon izlaganja temperaturi 0°C i 5°C u periodu od 2h

Tabela 2. Transkripti i proteini čija je ekspresija povećana kod raznih model organizama kao odgovor na nisku temperaturu.

Gen	Vrsta	Komentar
Hik19	<i>Synechocystis</i> sp. (cijanobakterije)	reguliše hladnoćom induciranu transkripciju gena za desaturazu masnih k.
Hik33	<i>Synechocystis</i> sp. (cijanobakterije)	reguliše hladnoćom induciranu transkripciju gena za desaturazu masnih k.
CMR1	<i>Rattus rattus</i>	odgovoran za transdukciju signala u neuronima tokom hladnoće
CIRP	<i>Mus musculus</i>	povećana ekspresija tokom hipotermije

Mikroerej analizom kod raznih model organizama identifikovan je veliki broj gena čija je ekspresija dovedena u vezu sa izlaganjem niskim temperaturama. Kod model organizma *Arabidopsis thaliana* nakon izlaganja temperaturi od 4,8°C u trajanju od 24 časa, povećava se ekspresija 40 transkripcionih faktora, 11 gena čiji su produkti uključeni u osmoprotekciju, 24 gena čiji su produkti uključeni u ćelijski metabolizam, 20 gena čiji su produkti uključeni u metabolizam uljenih hidrata, 4 gena za proteine toplotnog stresa i 6 gena koji kodiraju detoksifikacione enzime (Seki i sar., 2002). Slični rezultati su dobijeni i kod pirinča, jedino što je broj analiziranih gena bio manji (Rabbani i sar., 2003). Zanimljivo je da je kod *A. thaliana* bila povećana ekspresija β tubulina, a kod pirinča aktina, što ukazuje na promene u citoskeletu tokom pripreme za hladnoću. Kod *A. thaliana* je bila povećana ekspresija enzima glutation-S-transferaze, što je uočeno i kod kvasca nakon izlaganja temperaturi ispod 0°C (takođe primenom mikroerej tehnike) (Odani i sar., 2003). Makroerej analizom kod ribe *Ictalurus punctatus* identifikovane su značajne promene u ekspresiji gena čiji produkti ulaze u sastav ribozoma kao i povećanje u ekspresiji hsp70, gena za β aktin i kalmodulin inhibitor prilikom promene temperature sa 24°C na 18°C (Ju i sar., 2002). Geni koji pokazuju povećanu ekspresiju kod muva iz familije Sarcophagidae, kao rezultat hladnog tretmana uključuju: 11 gena koji kodiraju detoksifikacione enzime (uključujuću glutation-S-transferazu), 16 gena čiji su produkti uključeni u metabolizam, 21 gen čiji su produkti komponente citoskeleta (uključujući tubulin), 36 gena čiji su produkti povezani sa transkripcijom i translacijom (posebno elementi splajsozoma) 13 gena čiji su produkti

uključeni u signalnu transdukciju (posebno Ca vezujući i proteini kuplovani sa G proteinom) (Michaud i Denlinger, 2004). Iako je do sada Northern blot analizom potvrđeno prisustvo samo nekoliko ovih gena, jasno je da mikrorej analiza na ovom polju omogućava ogroman korak unapred olakšavajući identifikaciju glavne mreže gena za koju se ranije nije znalo da je uključena u odgovor na niske temperature.

Storey i Storey u revijalnom radu (2007) navode da je ulazak u hipometabolizam važna odlika preživljavanja mnogih organizama u nepovoljnim uslovima spoljašnje sredine (nedostatak kiseonika, niske ili visoke temperature, nedostatak hrane ili vode), a da su molekularni mehanizmi koji regulišu ulazak i izlazak iz ove faze, kao i oni koji stabilizuju organizam tokom perioda dormancije, visoko konzervisani među različitim filogenetskim linijama. Oni identifikuju nekoliko kriterijuma koji su neophodni za preživljavanje u stanju hipometabolizma a to su:

- smanjena stopa metabolizma
- obezbeđivanje izvora energije (npr. trigliceridi ili glikogen) i kontrola energetskog metabolizma
- pokretanje mehanizama signalne transdukcije da bi se koordinisao metabolički odgovor od strane svih ćelija i organa.
- reorganizacija i regulacija metaboličkih prioriteta koji su vezani za korišćenje ATP-a (jonske pumpe, transkripcija, translacija, rast i razviće)
- promene u genskoj ekspresiji i
- pojačanje odbrambenih mehanizama koji stabilizuju makromolekule i omogućavaju duži opstanak u hipometaboličkom stanju (antioksidativna odbrana, proteini toplotnog stresa, inhibitori serin proteaza).

Reorganizacija i regulacija metaboličkih prioriteta

Reorganizacija metaboličkih prioriteta tokom hipometabolizma uključuje gašenje mnogih neesencijalnih procesa, a održavanje procesa koji su kritični za život. Ove metaboličke promene se najčešće postižu kovalentnom modifikacijom ključnih enzima (proteina). Tako je reverzibilna fosforilacija proteina najučestaliji i najmoćniji mehanizam dostupan ćelijama za postizanje brzih stabilnih promena u aktivnosti ćelijskih proteina i zbog toga ima dominantnu ulogu u regulaciji hipometabolizma (Storey i Storey, 2004). Reverzibilnom fosforilacijom

proteina se reguliše aktivnost i kinetičke osobine ogromnog broja metaboličkih enzima i drugih funkcionalnih proteina kao što su membranski receptori i transporteri, jonski kanali, kao i proteini uključeni u transkripciju gena, sintezu i degradaciju proteina i regulaciju ćelijskog ciklusa. Kaskada signalne transdukcije, tj. transmisije i amplifikacije signala, čiji biološki odgovor je izmenjena funkcija određenog proteina ili genska ekspresija, takođe je regulisana fosforilacijom (Cowan i Storey, 2003; MacDonald, 2004).

Tokom hipometabolizma za očuvanje membranskog potencijala neophodno je održavanje transmembranskog gradijenta Na i K što se postiže uz korišćenje mnogo manje ATP-a, jer dolazi do smanjenog prolaska ovih jona u oba smera.

Interesantno je da mnogi metabolički putevi u stanju smanjenog metabolizma postaju posebno značajni. Tako, pentozofosfatni put ima značajnu ulogu tokom različitih vidova hipometabolizma. Poznato je da ovaj metabolički put predstavlja osnovni izvor redukovanog NADPH koji učestvuje u većini biosintetskih reakcija i produkciji redukovanih formi antioksidanata (glutation, tioredoksin), predstavlja izvor riboza koje su neophodne za sintezu DNK i RNK i predstavlja izvor šećera i njihovih fosfata sa različitim brojem ugljenikovih atoma (3-7) za mnoge procese u ćeliji. Glukoza-6-fosfat dehidrogenaza je ključni enzim tog puta i utvrđeno je da se tokom hipometabolizma njegova aktivnost i afinitet za supstrat povećavaju (Ramnanan i Storey, 2006). Pretpostavljeno je da je razlog za to upravo uloga ovog enzima i pentozofosfatnog puta u pojačanoj antioksidativnoj zaštiti, čiju osnovu čini NADPH koji se obezbeđuje na ovaj način. I zaista aktivnost glukoza-6-fosfat dehidrogenaze je povećana u odgovoru na oksidativni stres od kvasca do humanih ćelija (Ursini i sar., 1997), dok je smanjena aktivnost ovog enzima povezana sa smanjenim kapacitetom antioksidativne odbrane (Tian i sar., 1999). Zapaženo je da se pentozofosfatni put aktivira tokom sinteze sorbitola i glicerola u dijapauzirajućim jajima *Bombyx mori* (Kageyama, 1976), kao i tokom sinteze glicerola kod vrste *Protophormia terranova* (Wood i Nordin, 1980). Kod vrsta *Eurosta solidaginis* (Tsumuki i sar., 1987) i *Ostrinia nubilalis* (Stanić i sar., 2004) udeo pentozofosfatnog puta u katabolizmu glukoze se takođe značajno povećava sa sniženjem temperature. Kod insekata otpornih na niske temperature pentozofosfatni put je od izuzetnog značaja, jer je NADPH nastao u ovom metaboličkom putu neophodan i za sintezu poliola (Stanić i sar., 2004).

Supresija proteinske translacije i genske transkripcije je dobro dokumentovana tokom hipometabolizma (Storey i Storey, 2004; van Breukelen i sar., 2004; Horman i sar., 2005).

Postoji veliki broj mehanizama za supresiju transkripcije i gensko utišavanje. Oni uključuju modifikacije histona, regulaciju aktivnosti RNK polimeraze II, kao i post-transkripciono gensko utišavanje kao što je inhibitorno delovanje mikro RNK. To su mali nekodirajući RNK transkripti (18-25 bp) koji regulišu gensku ekspresiju vezivanjem za ciljne iRNK i na taj način inhibiraju njihovu translaciju ili ih vode u degradacione puteve (Bartel, 2004; Farh i sar., 2005). Nedavne studije, posebno kod biljaka, pokazuju da mikro RNK imaju važnu ulogu u adaptacijama na spoljašnju sredinu (Dalmay, 2006), a druge studije (Dresios i sar., 2005), su pokazale ulogu mikro RNK u regulaciji globalne proteinske sinteze u normalnim uslovima (37°C) i nakon hladnog šoka (32°C) u kulturi mišjih neuroblastoma ćelija. Iako ove studije ne oslikavaju nivo hladnog stresa sa kojima mnoge vrste moraju da se sretnu, one sugerišu da bi mikro RNK mogle imati ulogu u ćelijskom odgovoru na hladnoću i/ili ostale stresove spoljašnje sredine. Što se modifikacije histona tiče, smatra se da je to ključna komponenta epigenetskih događaja koji regulišu strukturu hromatina i gensku funkciju (Hassan i Zemleni, 2006). Poznate su mnoge modifikacije histona, dok je acetilacija tj. deacetilacija koja čini hromatin više ili manje pristupačan za transkripcionu mašineriju, verovatno najznačajnija modifikacija transkripcione aktivacije odnosno supresije (Holbert i Marmorstein, 2005).

Obzirom da organizam troši najviše energije na rast i razvoj, smatra se da ulaz u hipometabolizam uključuje i supresiju ćelijske proliferacije.

Promene u genskoj ekspresiji

Iako je ukupna proteinska sinteza u velikoj meri smanjena tokom hipometabolizma, svi organizmi koji su do sada analizirani imali su povećanu ekspresiju samo malog procenta gena. Kao što je rečeno, mogućnost identifikacije ovih gena je u velikoj meri porasla, primenom mikrorej tehnologije kojom je moguće u isto vreme analizirati ekspresiju više hiljada gena. Ovakve studije su identifikovale povećanu ekspresiju mnogih gena, koji pripadaju metaboličkim funkcijama koje do tada nisu povezivane sa hipometabolizmom, npr. geni koji kodiraju inhibitore serin proteaza, različite vrste antioksidativnih enzima, proteine koji skladište gvožđe kao i mitohondrijalni geni koji kodiraju subjedinice elektron transportnog lanca (Storey, 2003, 2004, 2006a, 2006b).

Pojačanje odbrambenih mehanizama koji stabilizuju makromolekule

Kada su izvori energije ograničeni i kada se dormancija mora održavati duži vremenski period mehanizmi koji štite, minimiziraju ili ispravljaju štete na makromolekulima su veoma važni, jer dormantan organizam ne može priuštiti veliku potrošnju ATP-a za "popravku", degradaciju ili zamenu oštećenih ćelijskih komponenti. Jedan od mehanizama koji je u velikoj meri analiziran je akumulacija metaboličkih protektanata niske molekulske mase. Primeri su visok nivo polihidroksilnih alkohola koje koriste insekti kao zaštitu od zamrzavanja, nakupljanje uree koja obezbeđuje otpornost na desikaciju ili visoka koncentracija trehaloze i prolina koji čuvaju membrane tokom anhidrobioze (Clegg, 2001; Storey, 1997). Postoji dosta ovakvih odbrambenih mehanizama koji štite proteine i kritični su za preživljavanje, a predstavljaju zajednički element hipometabolizma u različitim grupama filogenetskog stabla.

Poznato je štetno delovanje reaktivnih kiseoničnih čestica (eng. *Reactive Oxygen Species* - ROS) na biomolekule. ROS mogu da oštete mnoge makromolekule u ćeliji uključujući proteine, DNK i lipide. Oštećenja proteina često nastaju usled oksidacije slobodne tiol (-SH) grupe što vodi gubitku funkcije. U molekulima DNK, ROS najčešće dovode do formiranja timinskih dimera i prekida lanaca. Oštećenja lipida nastaju usled lipidne peroksidacije, kada nastaju lipidni peroksidi i lipidni radikali. To je lančana reakcija u kojoj kiseonični radikal preuzima atom vodonika iz nezasićene veze masne kiseline, nakon čega dolazi do reorganizacije molekula, reakcije sa kiseonikom pri čemu nastaje lipidni peroksi radikal (LOO·) koji dalje nastavlja lančanu reakciju. Polinezasićene masne kiseline su posebno osetljive na lipidnu peroksidaciju jer prisutnost dvostrukih veza slabi C-H veze na atomu ugljenika i olakšava premeštanje vodonika.

Antioksidativna zaštita deluje na tri nivoa: prevencija, "popravka" i ukljanjanje. Antioksidativna zaštita na nivou prevencije je najviše analizirana i uključuje metabolite (askorbat, vitamin E), peptide (glutation, tioredoksin), enzime (superoksid dismutazu, katalazu, glutation-S-transferazu, peroksiredoksin, glutation peroksidazu, glutation reduktazu, tioredoksin reduktazu itd.). Nedavni radovi pokazali su povećanje antioksidativne odbrane i/ili povećanje ekspresije gena koji kodiraju antioksidativne enzime tokom hipometabolizma (Hermes-Lima i sar., 2001; Hermes-Lima i Zenteno-Savin, 2002; Ramos-Vasconcelos i Hermes-Lima, 2003; Storey 2006a; Storey 2007). Sistem antioksidativne zaštite je možda još značajniji tokom oporavka od ovakvog stresa, jer uključuje ogromno povećanje potrošnje kiseonika koji dovodi do ogromne produkcije ROS i oštećenja koje oni uzrokuju.

Kod insekata reaktivne kiseonične čestice se sintetišu u različitim metaboličkim putevima, a njihov nivo je regulisan i sistemom antioksidativne zaštite. Ispitivanje uloge antioksidativnog sistema u odgovoru na spoljašnju sredinu i programirane adaptacije na niske temperature (Blagojević, 2007), sugerišu da sistem antioksidativne zaštite smanjuje rizik od oksidativnih oštećenja, ali utiče i na regulisanje redoks stanja u ćeliji, imajući u vidu da su ROS uključene i u signalnu transdukciju.

Brojna istraživanja su pokazala da su biohemijski mehanizmi koji omogućavaju otpornost insekata na niske temperature povezani sa antioksidativnom odbranom (Rojas i Leopold 1996; Grubor-Lajšić i sar., 1997; Joannis i Storey 1998; Jovanović-Galović i sar., 2004, 2007). Da je sinteza poliola čvrsto povezana sa antioksidativnim enzimima ukazuje prisustvo redukcionih ekvivalenata (NADPH), koji se generišu u pentozofosfatnom putu (Stanić i sar., 2004). Sa druge strane, glicerol, etilen glikol i trehaloza, jedinjenja koja potencijalno mogu da uklanjaju slobodne radikale akumuliraju se tokom zimskog perioda kod vrsta koje tolerišu zamrzavanje. Ova jedinjenja deluju i kao krioprotektanti i kao anhidroprotektanti (Block, 1990). Međutim, ostaje pitanje da li njihovo antioksidativno delovanje ima dodatnu fiziološku ulogu, ili je jednostavno posledica njihovih hemijskih osobina i relativno visoke koncentracije u kojoj se nakupljaju u određenim fiziološkim stanjima (Grubor-Lajšić i sar., 1992; Worland i sar., 1998, 2000).

Još jedna grupa gena čija je ekspresija povećana tokom hipometabolizma su inhibitori serin proteaza. To je velika superfamilija proteina koji deluju kao ireverzibilni kovalentni inhibitori proteaza koje seku specifične proteine. Smatra se da bi njihov povišen nivo tokom hipometabolizma mogao da bude ključan u regulisanju proteolitičkih reakcija i kaskade koja bi u suprotnom mogla da nanese kumulativne štete tkivu, tokom dužeg trajanja dormancije.

Proteini toplotnog stresa (eng. *Heat Shock Proteins – Hsps*) su grupa proteina čija se ekspresija povećava u ćeliji kao odgovor na različite vrste stresa i verovatno predstavljaju najbolje analiziranu komponentu ćelijskog odgovora na stres. Nazivi i podela proteina toplotnog stresa zasnovani su na njihovim molekulskim masama. Četiri osnovne funkcije proteina toplotnog stresa su da: i) stabilizuju osnovne strukturne proteine, ii) pomažu transfer proteina kroz membranu tako što menjaju njihovu konformaciju, iii) pomažu ponovno savijanje i zauzimanje ispravne konformacije denaturisanih proteina i iv) pomažu degradaciju aberantnih proteina. Često se nazivaju i molekularni šaperoni, jer omogućuju promenu trodimenzionalne strukture drugih molekula, mada nemaju svi proteini toplotnog stresa šaperonsku funkciju.

Šaperoni su proteini koji se vezuju za druge proteine i pomažu u procesima njihovog strukturiranja sa ciljem da se zauzme stabilna konformacija, pomažu združivanju oligomernih proteina, kao i transport u određeni ćelijski odeljak (Hendrick i Hartl, 1993). Mnogi tipovi šaperona su konstitutivno prisutni u ćeliji, ali je velik i broj onih koji se povećavaju u uslovima stresa (Goldberg, 2003). I zaista, zajednički odgovor na mnoge vrste stresa je supresija proteinske sinteze i aktivacija proteina toplotnog stresa. Razne studije su potvrdile sintezu proteina toplotnog stresa tokom hipometabolizma. Povišen nivo šaperona u hipometaboličkom stanju može da obezbedi dužu konformacionu stabilnost i životni vek ćelijskih proteina koji bi normalno bili zamenjeni, ali tokom hipometabolizma za koje je karakteristična ušteda energije to nije moguće. Jedan od prvih proteina toplotnog stresa koji je povezan sa hipometabolizmom je bio p26, mali protein, koji se akumulira u velikoj količini u cistama morskih račića roda *Artemia* (Willsie i Clegg, 2001; MacRae, 2003). Iako poseduje šaperonsku aktivnost, p26 takođe migrira u nukleus prilikom toplotnog stresa ili anoksije i smatra se da ima veoma važnu ulogu u represiji transkripcije. Akumulacija proteina toplotnog stresa Hsp23, Hsp70 je takođe dokumentovana prilikom odgovora na desikaciju u nedijapauzirajućim lutkama muva iz familije Sarcophagidae, a ovi proteini se nakupljaju u velikoj količini i u periodu kada larva ulazi u dijapauzu (Hayward i sar., 2004, 2005).

3. Cilj istraživanja

Cilj ovih istraživanja je bio ispitivanje molekularne osnove otpornosti na niske temperature dve vrste polarnih kolembola koje pripadaju različitim familijama i imaju različite strategije za preživljavanje niskih temperatura: *Onychiurus arcticus* (Tullberg, fam. Onychiuridae) sa Arktika i *Cryptopygus antarcticus* (Willem, fam. Isotomidae) sa Antarktika. To je uključilo:

- sakupljanje eksperimentalnih životinja i priprema eksperimentalnih grupa za molekularnu analizu
- početnu karakterizaciju genoma konstrukcijom cDNK biblioteka i generisanjem EST sekvenci
- konstrukciju mikroereja i identifikaciju gena koji menjaju svoju ekspresiju pri različitim temperaturama ili tokom različitih fizioloških stanja.

4. Materijal i metode

4.1. Eksperimentalne životinje

U istraživanjima su korišćene dve vrste polarnih kolembola: *Onychiurus arcticus* sa Arktika i *Cryptopygus antarcticus* sa Antarktika. Kolembole su mali beskrilni insekti, veličine nekoliko milimetara ili manje. Veoma su široko rasprostranjeni, opisano je preko 600 vrsta i smatra se da su najmnogobrojnija grupa zglavkara na planeti. Kolembole predstavljaju jednu od grupa kod kojih je osetljivost na niske temperature najbolje analizirana (Cannon i Block, 1988; Sinclair i sar., 2003a). Potrebno je naglasiti da pozicija reda Collembola u okviru filuma Arthropoda nije precizno definisana i da se u literaturi sreću različiti podaci. Prema tradicionalnoj klasifikaciji red Collembola se svrstava u subklasu beskrilnih insekata sa direktnim razvićem – Apterygota, a u klasu Insecta. Novijim istraživanjima, u kojima je poređena sekvenca mitohondrijalne DNK kolembola se više ne svrstavaju u klasu insekata, već kolembole i insekti predstavljaju odvojene grupe koje pripadaju subfilumu Hexapoda (Regier i sar., 2005).

Onychiurus arcticus

Arktička kolembola *O. arcticus* (Tullberg, fam. Onychiuridae) (Slika 1.) je široko rasprostranjena u severnom delu palearktičkog regiona (Fjellberg, 1980, 1984; Stach, 1962; Valpas, 1967). Letnja populacija *O. arcticus* ima srednju vrednost tačke superhlađenja – 6,1°C. Ova relativno visoka vrednost je stabilna tokom leta i na nju se ne može uticati aklimacijom (Block i sar., 1994). Međutim, dok je temperatura zemlje na mestu na kom su sakupljene kolembole tokom leta obično između +3 i +6 °C, tokom zime ona može da padne i do -20°C (Coulson i sar., 1995), sugerišući da moraju da se dese promene u otpornosti na niske temperature da bi preživele. Strategija koja je karakteristična za *O. arcticus* je krioprotektivna dehidracija (Worland, 1996; Holmstrup i Sømme, 1998; Worland i sar., 1998). Pored gubitka vode dolazi do brze akumulacije trehaloze, koja kao krio/anhidroprotektant snižava tačku superhlađenja i štiti membrane i proteine tokom gubitka vode (Rudolf i Crowe, 1985; Crowe i sar., 1987; Worland i sar., 1998). Trehaloza se sintetiše od glikogena i smatra se da je to hormonski regulisano (Steele, 1961), a gubitak vode dodatno povećava njenu koncentraciju.

Cryptopygus antarcticus

C. antarcticus, (Willem, fam. Isotomidae) (Slika 2.) je najmnogobrojniji i najrasprostranjeniji kopneni zglavkar u obalskim područjima antarktičkog i subantarktičkog regiona (Tilbrook, 1970, 1977). Ova vrsta ne toleriše zamrzavanje i karakteriše je bimodalna distribucija tačke superhlađenja tokom leta, gde jedna grupa jedinki mrzne na temperaturama između -6°C do -10°C , a druga između -18°C to -30°C (Sømme i Block, 1982; Worland i Convey, 2001). *C. antarcticus* je jedan od najčešće analiziranih antarktičkih vrsta u poslednjih 30 godina (Ewing, 1922; Gressitt, 1967; Janetschek, 1967; Tilbrook, 1977; Cannon i Block, 1988; Sinclair i Sjursen, 2001; Worland i Convey, 2001) što je umnogome doprinelo razumevanju otpornosti na niske temperature, međutim sve do ovih istraživanja u bazama podataka nisu postojale nikakve informacije vezane za genom ovog organizma.

4.2. Sakupljanje eksperimentalnih životinja i priprema za eksperiment

Onychiurus arcticus

Britanska arktička istraživačka stanica (eng. *The National Research Council's Arctic Station*) nalazi se u Novom Alesundu (78°55' s.g.š., 11°56' i.g.d.), na ostrvu Spitsbergen, Svalbard arhipelaga, koji pripada Kraljevini Norveškoj i deo je međunarodne istraživačke zajednice (Slika 1.). Klima u tom regionu je toplija nego što bi se očekivalo zbog uticaja Severne Atlantske struje. Srednja letnja temperature vazduha je između +2 i +5°C, međutim zamrzavanje zemljišta i vegetacije može da se desi u bilo kom mesecu. Zimi temperatura vazduha može da padne i ispod -30 °C, a prosečna temperature najhladnijeg zimskog meseca je -15°C. Polarna noć i polarni dan traju oko četiri meseca, a temperatura zemlje je 41 nedelju ispod nule, ostavljajući veoma kratak period za rast i reprodukciju živog sveta. Godišnja precipitacija u Novom Alesundu je 371 mm.

Eksperimentalne životinje *O. arcticus* su sakupljene u mahovini i ispod kamenja u obalskim područjima, i u podnožju litica naseljenih pticama, u blizini Novog Alesunda, nakon čega su transportovane u Britanski Institut za istraživanje Antarktika (eng. *British Antarctic Survey – BAS*). Adultni i juvenilni oblici su zajedno čuvani na +4°C, u plastičnim kutijama sa malim otvorom na poklopcu za ventilaciju. U kutijama se nalazila mahovina, lišajevi i zemlja sakupljena na istom mestu gde i uzorci. Redovno prskanje vodom obezbeđivalo je neophodnu vlažnost, a kao hrana korišćen je suvi pekarski kvasac.

Pripremljeno je pet grupa eksperimentalnih životinja za produkciju cDNK biblioteka:

- C** Kontrolne, žive kolebole, držane na +4°C.
- D1** Delimično dehidratisane kolebole, koje su sa početne temperature od +4°C ohlađene do temperature od -2°C stopom od 2°C nedeljno. Hlađene su u plastičnim kutijama u kojima se kao podloga nalazio vlažni CuSO₄ pomešan sa aktivnim ugljem u odnosu 4:1. Temperatura od -2°C se smatra kritičnom temperaturom na kojoj trehaloza počinje da se akumulira.
- D2** Potpuno dehidratisane kolebole, koje su sa početne temperature od +4°C ohlađene do temperature od -14°C stopom od 2°C nedeljno, takođe u plastičnim kutijama u kojima se kao podloga nalazio vlažni CuSO₄ pomešan sa aktivnim ugljem.

R1 Delimično rehidratirane kolembrole, koje su nakon temperature od -14°C ostavljene 8 časova na $+4^{\circ}\text{C}$ u prisustvu vlage da se rehidrišu.

R2 Potpuno rehidratirane kolembrole, koji su nakon temperature od -14°C ostavljene 24 časa na $+4^{\circ}\text{C}$ u prisustvu vlage da se rehidrišu.

Eksperimentalne životinje su nakon pripreme zamrznute u tečnom azotu i čuvane na -80°C .



Slika 1. Levo: položaj Britanske arktičke istraživačke stanice. Desno: *O. arcticus* pod elektronskim mikroskopom na temperaturi od $+4^{\circ}\text{C}$ i u potpuno dehidratiranom stanju na temperaturi od -14°C .

Cryptopygus antarcticus

Istraživačka stanice Rothera ($67^{\circ}34'$ j.g.š., $66^{\circ}8'$ z.g.d.) (eng. *Rothera Research Station*), Britanskog Instituta za istraživanje Antarktika nalazi se na zapadnoj strani antarktičkog poluostrva (Slika 2.). Letnje temperature vazduha na Roteri su obično u opsegu od 0 do 5°C , a zimske od -5 do -20°C , ali zbog blizine mora mogu veoma značajno da variraju. Vetrovi su česti, količina padavina je veoma niska, a sneg se može očekivati u bilo koje doba godine. Pošto se nalazi vrlo blizu Antarktičkog polarnog kruga, polarni dan i polarna noć traju samo nekoliko nedelja.

Eksperimentalne životinje su sakupljene u blizini stanice Rothera. Adultne i juvenilne kolebole su prosejane iz vlažne mahovine, nakon čega su sakupljene u plastične epruvete. Da bi se analizirao uticaj temperature na gensku ekspresiju, pripremljeno je pet grupa od po 300-400 kolembola za produkciju cDNK biblioteka:

C Kontrolne, žive kolebole, držane na +2°C.

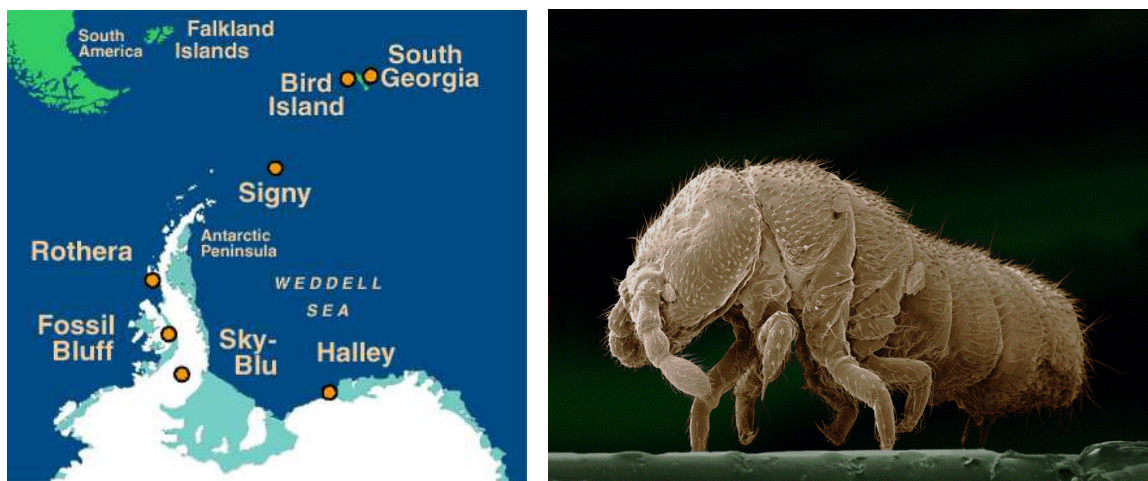
HLAĐENE Kolebole, koje su sa početne temperature od +2°C ohlađene u vodenom kupatilu do temperature od -5°C, stopom od 0,5°C/minuti.

GREJANE Kolebole, koje su sa početne temperature od +2°C zagrejane u vodenom kupatilu do temperature od 15°C, stopom od 1°C/minuti.

H – (eng. High Group) Kolebole čija je tačka superhlađenja bila iznad -15°C, jer su se zamrzle prilikom hlađenja do te temperature, stopom od 1°C/minuti u diferencijalnom skenirajućem kalorimetru (Mettler Toledo DSC 820).

L – (eng. Low Group) Kolebole čija je tačka superhlađenja bila ispod -15°C, jer se nisu zamrzle prilikom hlađenja do te temperature, stopom od 1°C/minuti u diferencijalnom skenirajućem kalorimetru.

Eksperimentalne životinje su nakon pripreme zamrznute u tečnom azotu i čuvane na -80°C.



Slika 2. Levo: položaj Istraživačke stanice Rothera na Antarktiku. Desno: *C. antarcticus* pod elektronskim mikroskopom.

4.3. Izolovanje RNK i konstrukcija cDNK biblioteka

Onychiurus arcticus

Totalna RNK je iz zamrznutih uzoraka izolovana pomoću *TRI* reagensa (Sigma Aldrich) i hloroforma po protokolu proizvođača, nakon čega je istaložena izopropil alkoholom. Talog je resuspendovan u vodi koja je oslobođena tragova RNaza. Koncentracija i integritet RNK su utvrđeni spektrofotometrijski (merenjem apsorbance na 260 i 280 nm) i elektroforetski (na 1,5% agaroznom 1xTBE gelu).

Sledeći korak je bio konstrukcija normalizovanih cDNK biblioteka pomoću *Trimmer-Direct* kita (Evrogen) i *SMART cDNA Library Construction* kita (BD Biosciences Clontech) prema protokolu Evrogen-a. cDNK predstavlja komplementarnu DNK koja se dobija procesom reverzne transkripcije od iRNK. *SMART cDNA Library Construction* kit je odabran zbog male količine početnog materijala, jer omogućava da se dobije dvolančana cDNK polazeći od samo 50 ng totalne RNK. Takođe, SMART tehnologija obezbeđuje generisanje cDNK molekula pune dužine pomoću mehanizma zamene RNK matrice (eng. *template switch mechanism*). Normalizacijom se smanjuje broj kopija gena koji su prisutni u velikom broju i drastično povećava efikasnost sekvenciranja i otkrića retkih transkripata. Napravljene su dve modifikacije Evrogen-ovog protokola koje su se odnosile na selekciju klonova i klonirajući vektor. Da bi izolovali klonove što veće dužine, *Chroma spin 400* su zamenjene *Chroma spin 1000* kolonama (BD Biosciences Clontech). cDNK su direkciono klonirane u *pal32* plazmid (Evrogen) između SfiI(1) i SfiI(2) restrikcionijskih mesta (GGCCATTACGGCCGGG del(CATGTC) GGCCGCCTCGGCC. Nakon toga elektroporacijom je izvršena transformacija bakterija *Escherichia coli*, soja DH10B (Invitrogen).

Cryptopygus antarcticus

Totalna RNK je iz zamrznutih uzoraka izolovana pomoću *TRI* reagensa (Sigma Aldrich), na isti način kao i kod vrste *O. arcticus*.

Koristeći *Oligotex mRNA Kit-Midi* (Qiagen), prečišćeno je 5 µg iRNK koja je upotrebljena za konstrukciju direkcionijskih plazmidnih cDNK biblioteka koristeći *pBluescript®II XR cDNA Library Construction Kit* (Stratagene). Nakon toga izvršena je transformacija kompetentnih ćelija *Escherichia coli XL10-Gold Ultracompetent Cells* (Stratagene).

4.4 cDNK sekvenciranje

Onychiurus arcticus

Matrica za DNK sekvenciranje je pripravljena PCR amplifikacijom cDNK inserata sa M13 prajmerima ili automatskim prečišćavanjem plazmida. Kontrola PCR produkata izvršena je na agaroznom gelu, a pozitivni produkti su ponovo zasejani i razblaženi do odgovarajuće koncentracije.

Kao priprema za izolaciju plazmida, kulture su gajene u specijalnim mikrotitar pločama sa 384 mesta i dubljim bunarućima, u 200 μ l 2xYT podloge. Inkubacija je trajala 17-18 časova na 1100 obrtaja u minuti. Plazmidi su izolovani i prečišćeni automatski modifikovanom metodom alkaline lize. Izvršena je kontrola kvaliteta plazmida, tako što je sa svake mikrotitar ploče slučajno odabrano osam uzoraka koji su analizirani na agaroznom gelu.

Sekvenciranje je izvršeno sa univerzalnim M13 – 40 prajmerom koristeći *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) na ABI 3730XL kapilarnom sekvenceru (Applied Biosystems). (Ovaj deo odrađen je u Max Planck Institutu za molekularnu genetiku u Berlinu, pod rukovodstvom dr Richard Reinhardt-a.)

Cryptopygus antarcticus

Transformisane ćelije *E. coli* su zasejane u Petri šolje na LB-agar podlogu sa 0,01% ampicilinom, koja je obezbeđivala Xgal plavo/belu selekciju klonova i gajene preko noći (Sambrook i sar., 1989). Bele kolonije su zatim prebačene u nove mikrotitar ploče i gajene preko noći u 100 μ l TB podloge sa 0,01% ampicilinom. Nakon dodavanja 40 μ l 50% glicerola mikrotitar ploče sa kolonijama su zamrznute.

cDNK inserti su amplifikovani PCR-om u finalnoj zapremini od 20 μ l uz sledeći sastav reakcione smeše: 1X PCR pufer (Bioline), 0,125 μ M oba prajmera (M13reverse: 5'-AACAGCTATGACCATGAT-3', M13forward: 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'), 0,084 mM of dNTPs (Bioline), 1,5 mM MgCl₂ (Bioline), i 0,5 U Taq polimeraze (Bioline). PCR je urađen u mikrotitar pločama sa 96 reakcionih mesta u koje je inokulirana mala količina bakterijskih klonova iz pomoću plastičnih adaptera. Nakon inicijalne denaturacije u trajanju od 2 minute na 96°C, termalni profil podrazumevao je 30 ciklusa denaturacije na 96°C u trajanju od 20 sekundi, aniling (hibridizacija prajmera) na 49°C u trajanju od 20 sekundi i elongacija na 72°C u trajanju od 3 minute. U poslednjem ciklusu elongacija je produžena na 5

minuta. Nakon umnožavanja PCR-om u svaki uzorak dodato je 30 µl sterilne destilovane vode, nakon čega su PCR produkti provereni elektroforetski na 1,5% agaroznom 1xTBE gelu. Enzimsko uklanjanje viška prajmera i dNTP-a izvršeno je sa 5 µl razblaženih PCR produkata, 0,4 U alkaline fosfataze (eng. *Shrimp Alkaline Phosphatase* - *SAP*) (GE Healthcare) i 0,6 U egzozukleaze I (ExoI) (GE Healthcare). Zatim je dodato *SAP dilution buffer* pufera (GE Healthcare) do finalne zapremine od 6 µl i reakcija je inkubirana 30 minuta na 37°C, a zatim 10 minuta na 80°C da se inaktiviraju enzimi. Nakon toga urađena je reakcija pripreme za sekvenciranje, gde je u tih 6 µl dodato 4 µl *ET-terminator pre-mix* (GE Healthcare) i 0,5 µl prajmera za sekvenciranje koncentracije 10 µM (M13reverse: 5'-AACAGCTATGACCATGATTACG-3'). Termalni profil reakcije sastojao se od 26 ciklusa: 20 sekundi inkubacije na 95°C i 140 sekundi na 60°C. Produkti su zatim precipitirani u 0,1 zapremini Na-acetata i 2,5 zapremine 100% etanola, isprani 70% etanolom, resuspendovani u 10 µl rastvora za nanošenje *Loading solution* (GE Healthcare) i sekvencirani na MegaBACE 1000 kapilarnom sekvenceru (GE Healthcare), koristeći standardne filtere.

4.5. Analiza EST sekvenci

Ukoliko samo jednom sekvenciramo cDNK klonove dobijamo EST sekvence (eng. *Expressed Sequence Tags*). Pošto je današnjim metodama veoma teško u jednom pokušaju sekvencirati cDNK klonove pune dužine, EST sekvence predstavljaju manje delove (200 – 800 bp) eksprimiranih gena koji se koriste za gensku identifikaciju.

Onychiurus arcticus

EST sekvence su u FASTA formatu analizirane pomoću Trace2dbest programa (Parkinson i sar., 2004), gde su podvrgnute detaljnoj kontroli kvaliteta: uklonjeni su delovi vektora, adapterske sekvence, poli-A repovi i baze niskog kvaliteta, nakon čega su prihvaćene samo sekvence duže od 150 baznih parova. Nakon analize, generisan je fajl pomoću koga su date sekvence poslate u EST bazu podataka dbEST (Boguski i sar., 1993), koja se nalazi u američkom Nacionalnom Centru za Biotehnoška Istraživanja (NCBI).

Klasterovanje, sortiranje sekvenci na osnovu sličnosti, je urađeno pomoću Tgcil (Pertea i sar., 2003) programa. Klasterovane su sekvence u okviru svake od definisanih pet cDNK biblioteka, kao i sve dobijene EST sekvence zajedno, a klasteri su zatim anotirani pomoću BLAST servisa (eng. *Basic Local Alignment Search Tool*). Korišćen je BLASTX (Altschul i sar., 1997), koji automatski prevodi nukleotidnu sekvencu u aminokiselinsku, u svih šest okvira čitanja i poredi sa sekvencama iz proteinske baze. Pretražene su UniProt/Swiss-Prot i UniProt/TrEMBL proteinske baze (UniProt Consortium, 2007), dana 12.06.2007. i prihvaćene su samo one anotacije za koje je E parametar bio manji od $1e^{-10}$.

Sekvence koje su imale pogotke u datim proteinskim bazama su zatim dodatno anotirane pomoću Genske Ontologije - GO (eng. *Gene Ontology*) (Ashburner i sar., 2000), dana 24.07.2007., gde se za svaki genski produkt opisuje njegova molekularna funkcija, biološki proces u kom učestvuje i ćelijski odeljak u kom deluje. Pomoću Blast2GO servisa (Conesa i sar., 2005) pretražena je baza podataka koja ne sadrži ponavljanja (eng. *non-redundant database*) (Benson i sar., 2007), i na taj način dobijen je drugačiji pogled na rezultate. Pomoću Gossip (Blüthgen i sar., 2005) programa, koji je inkorporisan u Blast2GO, urađena je statistička procena razlika u GO anotacijama između biblioteka.

Pojedine zanimljive EST sekvence su dodatno analizirane koristeći Emboss paket programa (Rice i sar., 2000). Klasterovane su pomoću ClustalW programa (Thompson i sar., 1994), a prikazane pomoću Mega4 programa (Tamura i sar., 2007). Poravnanje sekvenci je prikazano koristeći BoxShade v3.21 (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html).

Cryptopygus antarcticus

Sekvence su analizirane na isti način kao i kod vrste *O. arcticus*. Prvo su podvrgnute kontroli kvaliteta, zatim klasterovane i identifikovane pomoću BLASTX servisa. Jedina razlika je bila u tome što su prihvaćeni svi transkripti duži od 100 baznih parova.

Sekvence koje su imale pogotke u datim proteinskim bazama su zatim dodatno anotirane pomoću GO i GO Slim (Ashburner i sar., 2000). GO Slim predstavlja suženu verziju GO termina koji omogućava lakšu karakterizaciju procesa koji se dešavaju, bez udubljanja u te procese.

4.6. Štampanje mikroereja

Onychiurus arcticus

Mikroerej je konstruisan štampanjem 6912 cDNK koje su prethodno amplifikovane PCR-om. Iz cDNK biblioteke potpuno desikovanih kolembola (D2) uzeto je 3840 klonova za mikroerej, a iz cDNK biblioteke delimično desikovanih (D1), 3072 klona. Sve cDNK su štampane u duplikatu na pločicu, uz dodatak kontrolnih sekvenci *SpotReport Alien Array Validation System* (Stratagene).

Amplifikacija cDNK PCR-om urađena je u finalnoj zapremini od 20 µl uz sledeći sastav reakcione smeše: 1X PCR pufer (Bioline), 0,125 µM oba prajmera 5' amino modifikovana (pAL32FOR: 5'-TTCTCGGGAAGCGCG-3' i M13forward: 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'), 0,084 mM dNTP (Bioline), 1,5 mM MgCl₂ (Bioline), i 0,5 U Taq polimeraze (Bioline). PCR je urađen u mikrotitar pločama sa 96 reakcionih mesta u koje je inokulirana mala količina bakterijskih klonova iz mikrotitar ploča sa 384 mesta pomoću plastičnih adaptera. Nakon inicijalne denaturacije u trajanju od 2 minute na 96°C, termalni profil podrazumevao je 30 ciklusa denaturacije na 96°C u trajanju od 20 sekundi, aniling (hibridizacija prajmera) na 49°C u trajanju od 20 sekundi i elongacija na 72°C u trajanju od 3 minute. U poslednjem ciklusu elongacija je produžena na 5 minuta. Nakon umnožavanja PCR-om u svaki uzorak dodato je 30 µl sterilne destilovane vode, nakon čega su PCR produkti provereni elektroforetski na 1,5% agaroznom 1xTBE gelu.

Pre štampanja na mikroerej, PCR produkti su razblaženi puferom za štampanje do finalne koncentracije 250 mM Na₃PO₄ pH 8.5, 0,00025% *Sarkosyl*, što je praćeno centrifugiranjem u filtracionim mikrotitar pločama sa 96 mesta (Millipore). Nakon toga, 15 µl je preneto u mikrotitar ploče sa 384 mesta (Genetix Ltd) i štampano na aktiviranu amino-vezujuću staklenu pločicu *CodeLink* (Amersham) pomoću *Genetix Qarray* štampača (Genetix). Pločice su ostavljene preko noći u vlažnoj komori sa zasićenim rastvorom NaCl na sobnoj temperaturi, nakon čega su procesuirane u skladu sa protokolom proizvođača (Amersham).

Cryptopygus antarcticus

Mikrorej je konstruisan štampanjem 672 cDNK u duplikatu. cDNK su odabrane po principu slučajnosti, koristeći one mikrotitar ploče koje su imale najveći broj cDNK inserata. Sama procedura pripreme za štampanje i štampanje su urađeni isto kao kod vrste *O. arcticus*, uz jedinu razliku da su korišćeni drugi 5' amino modifikovani prajmeri za amplifikaciju (M13reverse: 5'-AACAGCTATGACCATGAT-3', M13forward: 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3').

4.7. Hibridizacija mikroereja

Onychiurus arcticus

Eksperimentalni dizajn podrazumevao je hibridizaciju pet različitih tretmana eksperimentalnih životinja, od kojih je svaki hibridizovan zajedno sa kontrolnom grupom kolembola. Urađeno je pet bioloških ponavljanja i tri tehnička ponavljanja, a jedna od tehničkih ponavljanja je bila zamena boja između tretmana i kontrole, da bi se izbegli artefakti vezani za boju. Pripremljene su sledeće grupe eksperimentalnih životinja za hibridizaciju:

- C** Kontrolne, žive kolebole, držane na +4°C.
- M2** Delimično dehidratisane kolebole, koje su sa početne temperature od +4°C ohlađene do temperature od -2°C stopom od 2°C nedeljno. Hlađene su u plastičnim kutijama u kojima se kao podloga nalazio vlažni CuSO₄ pomešan sa aktivnim ugljem u odnosu 4:1.
- M7** Potpuno dehidratisane kolebole, koje su sa početne temperature od +4°C ohlađene do temperature od -7°C stopom od 2°C nedeljno, takođe u plastičnim kutijama u kojima se kao podloga nalazio vlažni CuSO₄ pomešan sa aktivnim ugljem.
- PD** Delimično dehidratisane kolebole u uslovima konstantne relativne vlažnosti vazduha od 98 % (koja je postignuta pomoću zasićenih rastvora soli). Kolebole su dehidratisane otprilike u istoj meri kao i one koje su hlađene do temperature od -2°C.
- CD** Potpuno dehidratisane kolebole u uslovima konstantne relativne vlažnosti vazduha od 98 % (koja je postignuta pomoću zasićenih rastvora soli). Kolebole su dehidratisane otprilike u istoj meri kao i one koje su hlađene do temperature od -7°C.
- H18** Rehidratisane kolebole, koje su sa temperature od -7°C ostavljene 18 časova na +4°C u prisustvu vlage da se rehidrišu.

cDNK je pripremljena za hibridizaciju pomoću *SMART PCR cDNA Synthesis* kita (BD Biosciences Clontech) počinjući sa 500 ng totalne RNK. Produkti su prečišćeni pomoću kolona *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* kita (Amersham Pharmacia Biotech) i kvantifikovani spektrofotometrijski.

Obeležavanje cDNK je urađeno po sledećem protokolu: 250 ng dvolančane cDNA je dopunjeno vodom do 22 µl u šta je dodato 20 µl 2,5x Random Primer Reaction Buffer

(Invitrogen) i inkubirano 5 minuta na 100°C da se denaturiše, nakon čega je stavljeno na led. Zatim su dodati sledeći reagensi: 5 µl Low-C dNTP mix (5 mM dATP, 5 mM dGTP, 5 mM dTTP, 2 mM dCTP), 2 µl Cy3 ili Cy5-dCTP (Amersham) i 1 µl 40 U/µl Klenow polimeraze (Invitrogen), nakon čega je reakcija inkubirana 2 sata na 37°C u mraku. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 5 µl stop pufera (Invitrogen).

Obeleženi produkti su zatim prečišćeni pomoću AutoSeq G-50 kolona (Amersham Pharmacia Biotech), nakon čega su uzorci obeleženi Cy5 i Cy3 bojama pomešani, dodati su blokirajući agensi 6 µg natrijum polideoksiadenilat (koncentracije 2 µg/µl) 3 µl kvaščeve tRNA (koncentracije 2 µg/µl) (APBiotech) i cDNK je precipitirana etanolom. Obeleženi uzorci su resuspendovani u 20 µl hibridizacionog pufera (40% formamid, 5x SSC, 5x Denhardt rastvor, 1 mM Na pirofosfat, 50 mM Tris pH 7.4, 0.1% SDS), denaturisani 5 minuta na 95°C i ostavljeni da se ohlade 5 minuta na sobnoj temperature pre same hibridizacije.

Hibridizacija se odvijala pod pokrovnim staklom na 49°C preko noći u vlažnom inkubatoru Microarray Hybridisation Incubator ISO20 (Grant/Boeckel).

Nakon hibridizacije pokrovna stakla su uklonjena uranjanjem u 2 x SSC i 0,1% SDS rastvor. Pločice su zatim ispirane 15 minuta u 2 x SSC, 0,1% SDS rastvoru, 5 minuta u 2 x SSC i 0,1 x SSC rastvoru na sobnoj temperaturi. Nakon toga osušene su centrifugiranjem 4 minute na 1000 obrtaja u minuti i skenirane Axon GenePix 4100 microarray scanner (Axon Instruments/Molecular Devices).

Cryptopygus antarcticus

Eksperimentalni dizajn podrazumevao je hibridizaciju dva različita tretmana eksperimentalnih životinja, svaki zajedno sa kontrolnom grupom kolembola. Urađeno je pet bioloških ponavljanja i tri tehnička ponavljanja, a jedna od tehničkih ponavljanja je bila zamena boja između tretmana i kontrole, da bi se izbegli artefakti vezani za boju. Hibridizacija i ispiranje su se odvijali po istom protokolu kao kod *O. arcticus*. Pripremljene su sledeće grupe eksperimentalnih životinja za hibridizaciju:

H – (eng. High Group) Kolebole čija je tačka superhlađenja bila iznad -15°C, jer su se zamrzle prilikom hlađenja u diferencijalnom skenirajućem kalorimetru (Mettler Toledo DSC 820) do te temperature, stopom od 1°C/minuti.

L – (eng. Low Group) Kolembole čija je tačka superhlađenja bila ispod -15°C , jer se nisu zamrzle prilikom hlađenja u diferencijalnom skenirajućem kalorimetru do te temperature, stopom od $1^{\circ}\text{C}/\text{minuti}$.

4.8. Analiza rezultata mikroereja

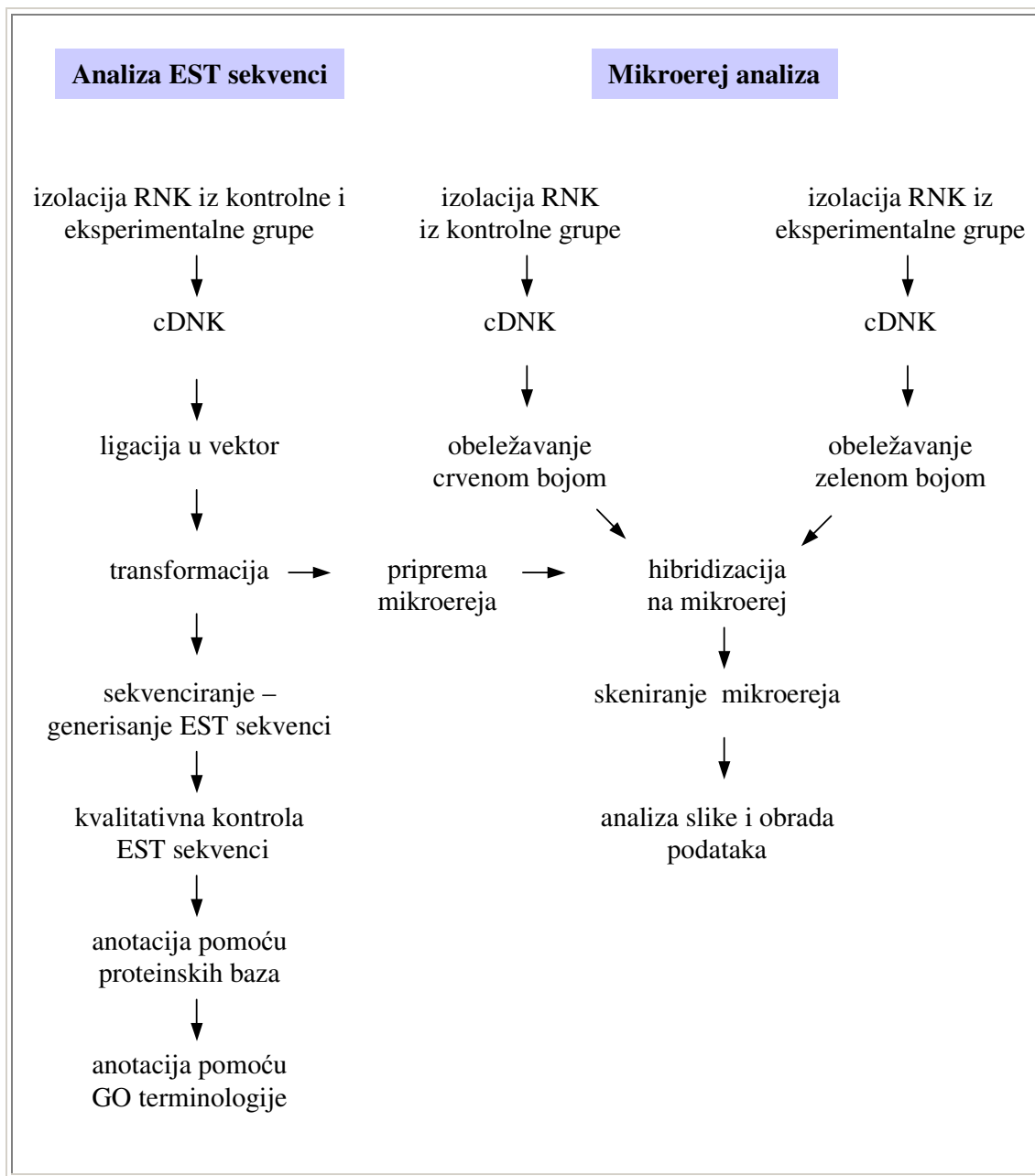
Onychiurus arcticus i *Cryptopygus antarcticus*

Sirovi podaci koji se dobijaju nakon skeniranja predstavljaju sliku sa različitim intenzitetima florescencije. Slike su analizirane pomoću GenePix 6.0 programa (Axon Instruments). Nakon automatskog prepoznavanja tačaka i definisanja njihovih granica, vizuelnom kontrolom su sve loše tačke obeležene i isključene iz dalje analize.

Statistički program R (<http://www.r-project.org/>), sa LIMMA (eng. *Linear Models for Microarray Data*) paketom (Smyth, 2004, 2005; Ritchie i sar., 2007; Smyth i Speed, 2003; Smyth i sar., 2005), je korišćen u daljoj analizi, za korekciju signala pozadine, normalizaciju i identifikaciju klonova čija se ekspresija razlikuje, uz korekciju lažno pozitivnih rezultata (eng. *False Discovery Rate - FDR*) i p vrednost od 0,01. Prisustvo pojedinih GO termina u većem broju je utvrđena proporcionalnim testom $p=0,01$, između ukupnog broja klonova na mikroereju koji imaju određeni GO termin i broja klonova koji pokazuju statistički značajno različitu ekspresiju u analiziranoj listi, a koji imaju identičan GO termin.

Dizajn i rezultati mikroereja za *C. antarcticus* su poslani u bazu podataka ArrayExpress (www.ebi.ac.uk/microarray-as/ae/) i može im se pristupiti pod rednim brojem A-MEXP-1128 i E-MEXP-1569.

Na Šemi 3. Prikazan je redosled metoda koje su korišćene u radu.



Šema 3. Pregled metoda i redosled kojim su korišćene u radu.

5. Rezultati

5.1. Rezultati analize EST sekvenci kod *Onychiurus arcticus*

Polazeći od pet grupa eksperimentalnih životinja: C-kontrolne, D1-parcijalno dehidratisane, D2-potpuno dehidratisane, R1-parcijalno rehidratisane i R2-potpuno rehidratisane konstruisano je pet cDNK biblioteka iz kojih je direkcionalnim sekvenciranjem sa 5' kraja generisano ukupno 16552 EST sekvenci. Nakon kontrole kvaliteta koja je podrazumevala uklanjanje delova vektora, adapterskih sekvenci, poli-A repova i baza niskog kvaliteta, kao i odbacivanja svih sekvenci kraćih od 150 baznih parova, ostalo je 16379 EST sekvenci koje su poslate u dbEST bazu podataka (Boguski i sar., 1993), a pristupni broj za date sekvence je 49109381-49125759 u dbEST bazi ili EW744731-EW761109 u GeneBank bazi podataka. Svaka biblioteka je doprinela između 17% i 23% ovom ukupnom broju sekvenci. Rezultati analize EST sekvenci za svaku biblioteku posebno, kao i za sve biblioteke zajedno su prikazani u Tabeli 3. Prosečna dužina svih EST sekvenci je bila 557 baznih parova. Klasterovanje svih sekvenci dalo je 9969 potencijalnih gena, od čega je bilo 7174 singltona i 2795 klastera. Što se klastera tiče, najveći je sadržao 30 EST sekvenci, a broj klastera sa 2, 3 ili više EST sekvenci dat je u Tabeli 3. Broj potencijalnih gena u pojedinačnim cDNK bibliotekama je varirao od 2451 do 3030, sa oko 85% singltona.

Biblioteke su normalizovane da bi se povećala šansa za detekciju retkih transkripata. I zaista, stope genskog otkrića (eng. *Gene Discovery*) i genske raznolikosti (eng. *Gene Diversity*) su bile visoke u svim bibliotekama (Tabela 3.). Gensko otkriće se definiše kao broj singltona podeljen sa ukupnim brojem EST sekvenci, a genska raznolikost kao broj potencijalnih gena podeljen sa ukupnim brojem EST sekvenci (Clark i sar., 2003). Minimalna genska raznolikost je bila 79%, dok je za sve biblioteke zajedno genska raznolikost bila 61%, a gensko otkriće 44%.

Potencijalni geni su pomoću BLASTX servisa poređeni sa sekvencama iz proteinske baze UniProt/Swiss-Prot i UniProt/TrEMBL (UniProt Consortium, 2007), dana 12.06.2007., a prihvaćene su one anotacije za koje je E parametar bio manji od $1e^{-10}$. Na ovaj način je identifikovano u proseku 40% sekvenci, dok ostalih 60% nije imalo nikakav pogodak u datim bazama (Tabela 3.).

Tabela 3. Pregled analize sekvenciranih cDNK klonova u svakoj od pet cDNK biblioteka kao i u svim bibliotekama zajedno kod *O. arcticus*.

Biblioteka	SVE	C	D1	D2	R1	R2
Br. EST sekvenci nakon analize kvaliteta	16379	2865	3414	3449	3852	2799
Prosečna dužina EST sekvenci (bp)	557	564	548	555	559	560
Br. Singltona	7174	2205	2432	2276	2488	2186
Br. Klastera	2795	269	409	463	542	265
Br. potencijalnih gena	9969	2474	2841	2739	3030	2451
Prosečan br. EST sekvenci po klasteru	3,29	2,45	2,40	2,53	2,52	2,31
Najveći br. EST sekvenci u klasteru	30	14	12	10	8	6
Br. Klastera sa 2 EST sekvence	1469	195	302	318	354	205
Br. Klastera sa 3 EST sekvence	549	48	72	86	133	42
Br. Klastera sa 4-5 EST sekvence	464	21	30	48	45	16
Br. Klastera sa 6-10 EST sekvenci	264	4	4	11	10	2
Br. Klastera sa >10 EST sekvenci	49	1	1	0	0	0
Gensko otkriće (eng. <i>Gene Discovery</i>)	0,44	0,75	0,71	0,64	0,65	0,78
Genska raznolikost (eng. <i>Gene Diversity</i>)	0,61	0,85	0,83	0,79	0,79	0,88
Br. potencijalnih gena sa pogotkom u Swiss-Prot bazi	3429(34%)	790(32%)	1085(38%)	1014(37%)	1130(37%)	814(33%)
Br. potencijalnih gena sa pogotkom u TrEMBL bazi	3970(40%)	916(37%)	1145(40%)	1196(44%)	1282(42%)	934(38%)
Br. potencijalnih gena bez pogotka u Swiss-Prot i TrEMBL bazama	5966(60%)	1548(63%)	1602(56%)	1535(56%)	1726(57%)	1507(61%)

Sekvence iz svake biblioteke su dodatno anotirane koristeći Blast2GO servis. Iako su biblioteke normalizovane, pomoću Gossip programa koji je inkorporisan u Blast2GO, urađena je statistička procena razlika u GO anotacijama između biblioteka i nisu pronađene statistički značajne razlike što ukazuje na činjenicu da je proces normalizacije bio relativno efikasan.

Tokom analize EST sekvenci gde god je bilo moguće korišćene su GO umesto BLAST anotacija jer su GO kategorije više generičke i informativnije od imena gena. Na ovaj način bila je olakšana identifikacija gena uključenih u određene biohemijske puteve, bez dubljeg poznavanja tih puteva, kao i identifikacija gena koji su kroz različite biohemijske puteve uključeni u isti proces u ćeliji. U daljem tekstu skraćenica PGO će se koristiti za anotacije vezane za biološki proces, FGO za molekulsku funkciju, a CGO za ćelijski odeljak.

Inicijalno fokus istraživanja se odnosio na generalne procese kao što su odgovor na nedostatak vode, abiotički stimulusi, gubitak vode i oporavak nakon suše. Na ovaj način identifikovano je samo 11 klonova iz 5 biblioteka, međutim neki od njih su bili veoma zanimljivi. Pretraživanjem GO termina vezanih za nedostatak vode (PGO:0009414) identifikovan je potencijalni akvaporin gen (isti klon je identifikovan i pretraživanjem GO termina za akvaporin), a pretraživanjem termina vezanih za odgovor na vodu (PGO:0009415) identifikovana je EST sekvenca čiji je produkt sličan sa dehidrinom koji se sintetiše kod biljaka kao odgovor na vodeni stres (ovaj klon ne bi bilo moguće identifikovati pomoću BLAST anotacija). Pošto je samo mali broj klonova identifikovan na ovaj način u daljem radu prešlo se na pretraživanje specifičnih gena.

Geni čiji su produkti uključeni u metabolizam trehaloze i glikogena

Inicijalno je biohemijski put trehaloze pretražen samo pomoću GO termina vezanih za molekulsku funkciju i na ovaj način identifikovano je svega nekoliko klonova: 3 klona za alfa, alfa-trehalozo-fosfat sintaznu aktivnost (FGO:0003825), nijedan klon nije pronađen za trehalozo transmembransku transportna aktivnost (FGO:0015574), a 3 su pronađena za trehalozo-fosfatazna aktivnost (FGO:0004805) (Tabela 4.). Zbog organizacije GO terminologije i ponavljanja na različitim nivoima, svih 6 identifikovanih klonova je imalo istu BLAST anotaciju: trehalozo-6-fosfat sintaza. Slično, kada su identifikovani geni uključeni u metabolizam glikogena, identifikovano je ukupno 137 klonova (rezultati nisu prikazani) ali je

analiza BLAST pogodaka pokazala da većina predstavlja isti gen: glikogen fosforilazu. U daljoj analizi pretraga je proširena na GO termine vezane za biološki proces i ćelijski odeljak i dobijeno je 19 pogodaka za metabolički proces trehaloze (PGO:0005991). Pretraživanjem biblioteka za trehalaznu aktivnost (FGO:0015927) i alfa, alfa trehalaznu aktivnost (FGO:0004555) identifikovano je 3 i 5 klonova respektivno (Tabela 4.).

Tabela 4. Broj klonova u cDNK bibliotekama koji imaju GO anotacije vezane za metabolizam trehaloze kod *O. arcticus*.

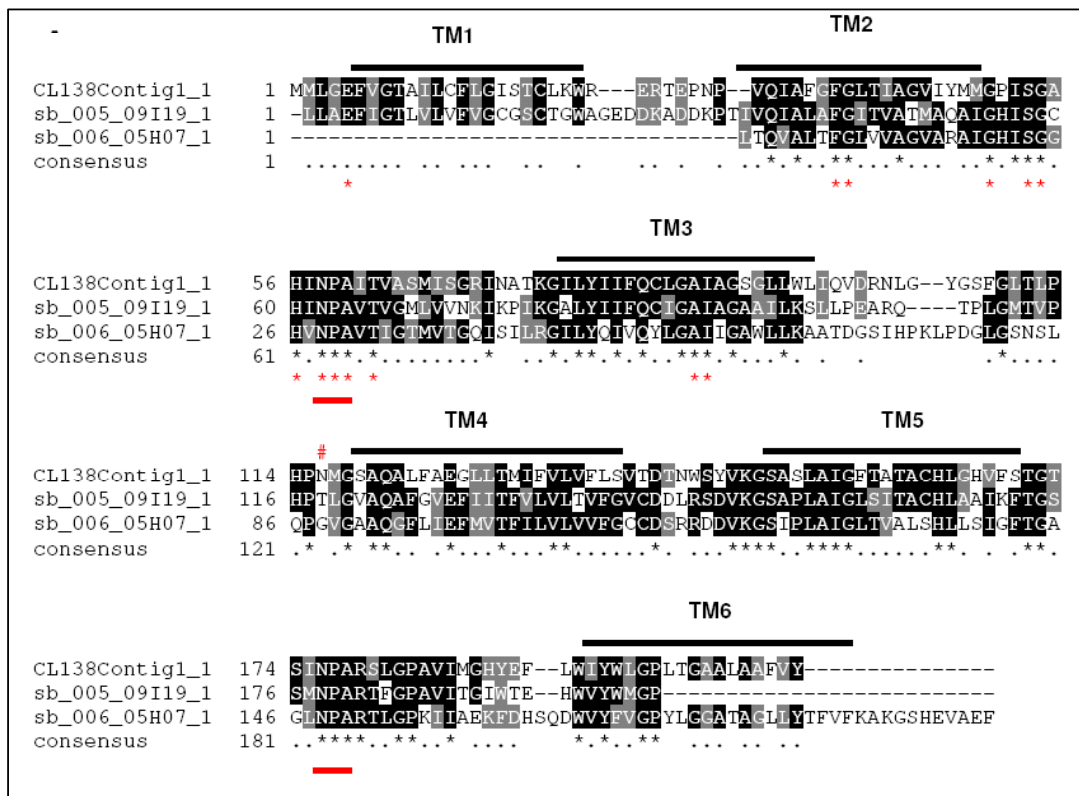
GO anotacija	Broj klonova u bibliotekama				
	C	D1	D2	R1	R2
Alfa, alfa-trehalazna aktivnost FGO:0004555	0	2	1	1	1
Trehalazna aktivnost FGO:0015927	0	1	1	0	1
<i>Ukupno</i>	<i>0</i>	<i>3</i>	<i>2</i>	<i>1</i>	<i>2</i>
Alfa, alfa-trehalozo-fosfat sintazna aktivnost FGO:0003825	0	1	1	1	0
Alfa, alfa-trehalozo-fosfat sintazni kompleks CGO:0005946	0	0	0	1	0
Biosintetski proces trehaloze PGO:0005992	1	1	2	2	1
Katabolički proces trehaloze PGO:0005993	0	1	1	0	1
Metabolički proces trehaloze PGO:0005991	1	3	10	2	3
Aktivnost vezana za transm. transport trehaloze FGO:0015574	0	0	0	0	0
Transport trehaloze PGO:0015771	0	0	0	0	0
Trehalozo-fosfatatna aktivnost FGO:0004805	0	1	1	1	0
<i>Ukupno</i>	<i>2</i>	<i>7</i>	<i>15</i>	<i>7</i>	<i>5</i>

Geni za akvaporine (AQP)

Pretraživanjem GO termina za kanal za vodu (FGO:0015250) u svim bibliotekama dalo je ukupno 7 klonova, od kojih su 4 bili singltoni, a 3 su pripadala jednom klasteru. Analizom BLAST pogodaka utvrđeno je da se radi o 3 potencijalno različita akvaporina, a translacijom individualnih klonova i njihovim poravnanjem to je i potvrđeno (Slika 3.). U Tabeli 5.

prikazan je procenat aminokiselinske identičnosti između 3 potencijalno različita akvaporina i iz nje se vidi da je homologija između akvaporina je bila relativno niska sa maksimalnih 49,4% aminokiselinske identičnosti.

Radi lakšeg snalaženja, u daljem tekstu ta tri različita akvaporina će biti obeleženi kao AQP-X, AQP-Y i AQP-Z. AQP-X je u EST bazi podataka predstavljen sa dva singltona (sb_005_09I19 i sb_006_02P03), koji su identifikovani u bibliotekama C i D2. AQP-Y je takođe predstavljen sa dva singltona (sb_006_05H07 i sb_008_01I03), koji su identifikovani u bibliotekama D2 i R2, a AQP-Z je predstavljen klasterom CL138Contig1 koji se sastoji od tri klona (sb_006_06B09, sb_006_04A12 i sb_006_08O08) koji su identifikovani samo u biblioteci D2.



Slika 3. Poravnanje tri translirana potencijalna akvaporin gena kod *O. arcticus*. Klaster CL138Contig1 predstavlja AQP-Z, klon sb_005_09I19 predstavlja AQP-X, a sb_006_05H07 predstavlja AQP-Y.

Tabela 5. Procenat aminokiselinske identičnosti između tri potencijalna akvaporina kod *O. arcticus*. Svi klonovi su dovedeni na istu dužinu da bi se uradila ova izračunavanja.

	AQP-X	AQP-Y
AQP-Z	46,8%	40,8%
AQP-X		49,4%

Geni čiji su produkti uključeni u antioksidativnu zaštitu ćelije

Sve biblioteke su pretražene za GO termine povezane sa antioksidativnom aktivnošću (vodonik peroksid, melanin, katalaza, superoksid dismutaza, glutation, glutation transferaza i glutation reduktaza), kako za molekulsku funkciju, tako i za biološki proces. Na ovaj način identifikovan je veliki broj, 387 klonova (Tabela 6.).

Tabela 6. Broj klonova u cDNK bibliotekama koji imaju GO anotacije vezane za antioksidativnu aktivnost kod *O. arcticus*.

GO anotacija	Broj klonova u bibliotekama				
	C	D1	D2	R1	R2
Vodonik peroksid	18	24	17	16	11
Melanin	2	5	5	3	1
Katalaza	14	19	18	19	9
Superoksid dismutaza	3	9	7	6	4
Glutation transferaza	8	16	10	12	10
Glutation reduktaza	6	5	5	4	0
Glutation	16	32	22	18	13
<i>Ukupno</i>	<i>67</i>	<i>110</i>	<i>84</i>	<i>78</i>	<i>48</i>

Geni čiji su produkti uključeni u presvlačenje

Što se tiče gena čiji su produkti uključeni u presvlačenje pretraživanjem GO anotacija identificirano je 10 klonova kod delimično desikovanih kolembola D1, 24 kod delimično rehidratiranih R1, 14 kod potpuno rehidratiranih R2, 8 u kontrolnoj grupi C i 5 kod potpuno desikovanih kolembola D2 (rezultati nisu prikazani).

Geni za LEA proteine

Od analiziranih gena i puteva jedino LEA proteine (eng. *Late Embryogenesis Abundant - LEA*) nije bilo moguće identifikovati pomoću GO anotacija. Pretraživanjem BLAST anotacija nađen je klaster od dva klona prisutna u biblioteci D2 i jedan klon u D1. Translacijom ova tri klona i njihovim poravnanjem utvrđeno je da se radi samo o jednom genu.

Treba napomenuti da je primarni BLAST pogodak za ovaj klon bio neokarakterisani protein iz komarca žute groznice (Q1DH19), što znači da je sa njim imao najveću sličnost. Nakon toga, analizirani klon je pokazao sličnost sa nekoliko neokarakterisanih proteina, zatim sličnost sa brojnim proteinima koji sadrže abhidrolazni domena i sličnost sa LEA proteinom pirinča *Oryza sativa*. Za LEA protein, E parameter je bio $6,4e-11$ (Slika 4.). Na aminokiselinskom nivou identičnost je bila mala, sa prvim neokarakterisanim proteinom 45%, a sa LEA proteinom 31% (Slika 4.).

```
>URL00:UniRef100_Q6ISU7 Cluster: Putative embryogenesis-associated protein;
n=1; Oryza sativa (japonica cultivar-group) (Rep: Putative
embryogenesis-associated protein - Oryza sativa subsp. japonica
(Rice))
Length = 581

Plus Strand HSPs:

Score = 179 (68.1 bits), Expect = 6.4e-11, P = 6.4e-11
Identities = 54/170 (31%), Positives = 89/170 (52%), Frame = +2

Query: 101 HREQKMAKFLQKHVKILQSTYWPVAVFYWEGRMQTIIF-GLTKRIPNSQKIPYKREVFVLSD 277
HR + L H + L +T W A +QT+F ++ R P+ Y+R+++ + D
Sbjct: 71 HRVASKCRSL--HGRYL-ATPWLA---SPHLQTLFLSISGRPPS---FTYRRLTYVRD 120

Query: 278 GGELALDFI---EPKPEH-----RSERENLIVFLPLPGLTSSSQTSYVKTLVMAITE 421
GG +ALD++ + + E R + L+V ++PGLTS S +YVK LV ++
Sbjct: 121 GGTIALDWLLASDCEEEDVGFCDGVISRDDSTPLVV-VIPGLTSDSTAAYVKHLVFSMAS 179

Query: 422 VGGTVVAFNNRGIGGIPLKTPRTHNAVNCEDIREVITHIKNLYPNDKMMMA 571
G VV N+RG+GGI + + +NA ED RE++ ++ YP + A
Sbjct: 180 KGWNVVVGNRHRLGGISITSDCFYNAGWTEDFREIVNYLHQKYPQAPLFA 229
```

Slika 4. Poravnanje transliranog potencijalnog LEA gena kod *O. arcticus* i LEA proteina pirinča. Crvenom linijom obeležena je homologija sa abhidrolaznim domenom.

Razlike u EST sekvencama između biblioteka

Pošto je primarni cilj produkcije EST klonova bila konstrukcija mikroereja, biblioteke su normalizovane da bi se povećale šanse za otkriće retkih transkripata. Normalizacija je onemogućila dublju analizu ekspresije gena na nivou EST sekvenci, međutim prisustvo ili odsustvo genske ekspresije u nekoj biblioteci bi se moglo naslutiti na osnovu prisustva ili odsustva datog klona iz date biblioteke. Izvesno je da su mnoge GO anotacije imale sličnu distribuciju u svim bibliotekama, ali kada su identifikovane veoma specifične enzimske reakcije ili geni mogle su se uočiti razlike između biblioteka koje su predstavljene u Tabeli 7. Identifikacija kandidatnih gena koji su uključeni u proces dehidratacije i neke opšte razlike u genskoj ekspresiji između biblioteka moraju da budu potvrđene, dobijanjem pune sekvence gena RACE-PCR-om, mikroerej analizom i Q-PCR analizom.

Tabela 7. Prisustvo pojedinih EST klonova u različitim bibliotekama kod *O. arcticus*.

Gen	C	D1	D2	R1	R2
Potencijalni LEA protein		+	+		
AQP-X	+		+		
AQP-Y			+		+
AQP-Z			+		
Abhidrolaza		+	+		
Trehalazna aktivnost		+	+	+	+

5.2. Rezultati analize mikroereja kod *Onychiurus arcticus*

Sa ciljem da se prati promena ekspresije gena, na mikroerej je hibridizovana cDNK iz pet različitih tretmana eksperimentalnih životinja: M2-delimično dehidratisane hlađenjem do temperature od -2°C , M7-potpuno dehidratisane hlađenjem do temperature od -7°C , PD-delimično dehidratisane kolebole u uslovima konstantne relativne vlažnosti vazduha, CD-potpuno dehidratisane kolebole u uslovima konstantne relativne vlažnosti vazduha i H18-rehidratisane kolebole, svaka zajedno sa cDNK iz kontrolne grupe životinja.

U Tabeli 8. dat je ukupan broj klonova čija je ekspresija statistički značajno povećana prilikom poređenja različitih tretmana međusobno, kao i tretmana i kontrole. Najveći broj klonova, 1367 imao je povećanu ekspresiju u CD u poređenju sa H18, a najmanji broj 80 u M7 u poređenju sa PD.

Tabela 8. Ukupan broj klonova čija je ekspresija statistički značajno povećana prilikom poređenja različitih tretmana međusobno, kao i tretmana i kontrole kod *O. arcticus*.

Poređenje:	M2>C	M2>M7	M2>PD	M2>CD	M2>H18
Broj klonova:	343	507	656	445	1001
Poređenje:	M7>M2	M7>C	M7>PD	M7>CD	M7>H18
Broj klonova:	401	625	80	924	1062
Poređenje:	PD>M2	PD>M7	PD>C	PD>CD	PD>H18
Broj klonova:	564	113	527	960	932
Poređenje:	CD>M2	CD>M7	CD>PD	CD>C	CD>H18
Broj klonova:	452	935	990	416	1367
Poređenje:	H18>M2	H18>M7	H18>PD	H18>CD	H18>C
Broj klonova:	893	823	797	1129	599

U daljem radu, se zbog velikog broja podataka, analiza usmerila na identifikaciju gena koji bi bili zanimljivi tokom procesa dehidratacije, a čija je ekspresija statistički značajno povećana u tretmanima u odnosu na kontrolnu grupu eksperimentalnih životinja. Rezultati su prikazani u Tabelama 9., 10., 11., 12. i 13. Praćena je promena ekspresije gena uključenih u metabolizam

ugljenih hidrata, gena za proteine toplotnog stresa, gena čiji produkti učestvuju u antioksidativnoj odbrani, gena za desaturaze, lektine kao i proteine sa abhidrolaznim domenom.

Tabela 9. Klonovi čija je ekspresija statistički značajno povećana u M2 tretmanu u poređenju sa kontrolnim eksperimentalnim životinjama, a koji su potencijalno uključeni u proces dehidratacije kod *O. arcticus*.

	BLAST identifikacija	BLAST anotacija	Baza
M2>C	Q2F5Q5 Q2F5Q5_BOMMO	Lektin 4 C-tip	Swiss-Prot
	O62849 ACOD_SHEEP	Acil-CoA desaturaza	TrEMBL
	A2I3W3 A2I3W3_9HEMI	Potencijalni mali protein toplotnog stresa	Swiss-Prot
	Q0KKB2 Q0KKB2_MAMBR	Protein toplotnog stresa 20,7	Swiss-Prot
	Q5R1P7 Q5R1P7_BOMMO	Protein toplotnog stresa 19,9	Swiss-Prot
	A3EY17 A3EY17_9HEMI	Potencijalni trehalozo-6-fosfat sintaza 1	Swiss-Prot
	Q58I82 Q58I82_AEDAE	UDP-glukoza pirofosforilaza	Swiss-Prot
	Q2KKJ3 Q2KKJ3_SOLIN	Glukoza transporter 8	Swiss-Prot
	Q3BZ17 Q3BZ17_XANC5	Izocitrat liaza	Swiss-Prot
	P13244 MASY_BRANA	Malat sintaza	TrEMBL
	Q0IIS3 ABHD7_XENTR	Protein 7 sa abhidrolaznim domenom	TrEMBL
	O81187 GLRX_VERFO	Glutaredoksin	TrEMBL
	Q6QA66 Q6QA66_9ACAR	Feritin	Swiss-Prot
	Q7Z161 Q7Z161_LEPDE	Feritin	Swiss-Prot
	Q2XW13 Q2XW13_BOOMI	Fosfolipid-hidroperoksid glutat. peroksidaza	Swiss-Prot
P46433 GSTT4_MUSDO	Glutation-S-transferaza 4	TrEMBL	

Tabela 10. Klonovi čija je ekspresija statistički značajno povećana u M7 tretmanu u poređenju sa kontrolnim eksperimentalnim životinjama, a koji su potencijalno uključeni u proces dehidratacije kod *O. arcticus*.

	BLAST identifikacija	BLAST anotacija	Baza
M7>C	Q16KB1 Q16KB1_AEDAE	Sfingolipid δ -4 desaturaza/c-4 hidroksilaza	Swiss-Prot
	O62849 ACOD_SHEEP	Acil-CoA desaturaza	TrEMBL
	A2I3W3 A2I3W3_9HEMI	Potencijalni mali protein toplotnog stresa	Swiss-Prot
	Q5R1P7 Q5R1P7_BOMMO	Protein toplotnog stresa 19,9	Swiss-Prot
	A3EY17 A3EY17_9HEMI	Potencijalni trehalozo-6-fosfat sintaza 1	Swiss-Prot
	Q58I82 Q58I82_AEDAE	UDP-glukoza pirofosforilaza	Swiss-Prot
	Q4VXH6 Q4VXH6_HUMAN	6-fosfoglukonat dehidrogenaza	Swiss-Prot
	Q2KKJ3 Q2KKJ3_SOLIN	Glukoza transporter 8	Swiss-Prot
	Q3BZ17 Q3BZ17_XANC5	Izocitrat liaza	Swiss-Prot
	Q6IE26 ABHD7_MOUSE	Protein 7 sa abhidrolaznim domenom	TrEMBL
	A0FDR1 A0FDR1_BOMMO	Protein sličan tioredoksinu	Swiss-Prot
	Q26059 Q26059_PACLE	Peroksinektin precursor	Swiss-Prot
	Q53YK5 Q53YK5_ARATH	Peroksizomalna sarkozin/pipekolat oksidaza	Swiss-Prot
	O81187 GLRX_VERFO	Glutaredoksin	TrEMBL
	Q6QVQ5 Q6QVQ5_ANOGA	Superoksid dismutaza 2	Swiss-Prot
Q7Z161 Q7Z161_LEPDE	Feritin	Swiss-Prot	
P46433 GSTT4_MUSDO	Glutation-S-transferaza 4	TrEMBL	

Tabela 11. Klonovi čija je ekspresija statistički značajno povećana u PD tretmanu u poređenju sa kontrolnim eksperimentalnim životinjama, a koji su potencijalno uključeni u proces dehidratacije kod *O. arcticus*.

	BLAST identifikacija	BLAST anotacija	Baza
PD>C	A2I3W3IA2I3W3_9HEMI	Potencijalni mali protein toplotnog stresa	Swiss-Prot
	Q5R1P7IQ5R1P7_BOMMO	Protein toplotnog stresa 19,9	Swiss-Prot
	A3EY17IA3EY17_9HEMI	Potencijalni trehalozo-6-fosfat sintaza 1	Swiss-Prot
	Q58I82IQ58I82_AEDAE	UDP-glukoza pirofosforilaza	Swiss-Prot
	Q4VXH6IQ4VXH6_HUMAN	6-fosfoglukonat dehidrogenaza	Swiss-Prot
	Q2KKJ3IQ2KKJ3_SOLIN	Glukoza transporter 8	Swiss-Prot
	Q3BZ17IQ3BZ17_XANC5	Izocitrat liaza	Swiss-Prot
	O81187IGLRX_VERFO	Glutaredoksin	TrEMBL
	Q6QA66IQ6QA66_9ACAR	Feritin	Swiss-Prot
	Q26059IQ26059_PACLE	Peroksinektin precursor	Swiss-Prot
	P46433IGSTT4_MUSDO	Glutation-S-transferaza 4	TrEMBL
	P46428IGST_ANOGA	Glutation-S-transferaza	TrEMBL

Tabela 12. Klonovi čija je ekspresija statistički značajno povećana u CD tretmanu u poređenju sa kontrolnim eksperimentalnim životinjama, a koji su potencijalno uključeni u proces dehidratacije kod *O. arcticus*.

	BLAST identifikacija	BLAST anotacija	Baza
CD>C	(Q2F5Q5IQ2F5Q5_BOMMO)	Lektin 4 C-tip	Swiss-Prot
	Q16KB1IQ16KB1_AEDAE	Sfingolipid δ -4 desaturaza/c-4 hidroksilaza	Swiss-Prot
	A3EY17IA3EY17_9HEMI	Potencijalni trehalozo-6-fosfat sintaza 1	Swiss-Prot
	Q28DR1IQ28DR1_XENTR	Glukoza-6-fosfat dehidrogenaza	Swiss-Prot
	Q9EQS0ITALDO_RAT	Transaldolaza	TrEMBL
	Q0IIS3IABHD7_XENTR	Protein 7 sa abhidrolaznim domenom	TrEMBL
	Q9D1Q6ITXND4_MOUSE	Protein koji sadrži tioredoksin domen	TrEMBL
	Q498S5IQ498S5_RAT	Faktor biogeneze peroksizoma 7	Swiss-Prot
	Q3HVI8IQ3HVI8_SOLIN	Glutation-S-transferaza	Swiss-Prot
	Q5UEN9IQ5UEN9_9HEMI	Protein sličan glutation-S-transferazi	Swiss-Prot
	Q6J1M5IQ6J1M5_ANCCA	Glutation-S-transferaza	Swiss-Prot

Tabela 13. Klonovi čija je ekspresija statistički značajno povećana u H18 tretmanu u poređenju sa kontrolnim eksperimentalnim životinjama, a koji su potencijalno uključeni u proces dehidracije kod *O. arcticus*.

	BLAST identifikacija	BLAST anotacija	Baza
H18>C	Q9BIR7IHSP75_DROME	Protein toplotnog stresa Hsp70Bc	TrEMBL
	P29845IHSP7E_DROME	Protein toplotnog stresa Hsc70-5	TrEMBL
	Q8I866IQ8I866_SPOFR	Protein toplotnog stresa Hsc70	Swiss-Prot
	Q17DV9IQ17DV9_AEDAE	Glukoza dehidrogenaza	Swiss-Prot
	P18172IDHGL_DROPS	Glukoza dehidrogenaza (akceptor)precursor	TrEMBL
	Q91X52DCXR_MOUSE	L-ksiluloza reduktaza	TrEMBL
	Q9Z2V4IPCKC_MOUSE	Fosfoenolpiruvat karboksikinaza, citopl.	TrEMBL
	A0EJ86IA0EJ86_9CNID	Katalaza	Swiss-Prot
	Q802D8IQ802D8_MELUD	Katalaza	Swiss-Prot
	A0FDR1IA0FDR1_BOMMO	Protein sličan tioredoksinu	Swiss-Prot
	Q26059IQ26059_PACLE	Peroksinektin precursor	Swiss-Prot
	Q6RUR4IQ6RUR4_GRYOR	Glutation-S-transferaza	Swiss-Prot

U eksperimentu je posebno praćena ekspresija tri potencijalno različita akvaporin gena koji su radi pojednostavljenja obeleženi sa AQP-X, AQP-Y i AQP -Z. U Tabeli 14. prikazano je prilikom poređenja kojih tretmana međusobno, kao i tretmana i kontrole dolazi do statistički značajno povećane ekspresije kojih od ova tri akvaporina.

Tabela 14. Statistički značajno povećanje ekspresije akvaporin gena prilikom poređenja različitih tretmana međusobno, kao i tretmana i kontrole kod *O. arcticus*.

Poređenje:	M2>C	M2>M7	M2>PD	M2>CD	M2>H18
Akvaporin:	/	/	/	/	AQP-Z
Poređenje:	M7>M2	M7>C	M7>PD	M7>CD	M7>H18
Akvaporin:	/	/	/	/	/
Poređenje:	PD>M2	PD>M7	PD>C	PD>CD	PD>H18
Akvaporin:	AQP-X, Y	/	/	AQP-Y	AQP-X
Poređenje:	CD>M2	CD>M7	CD>PD	CD>C	CD>H18
Akvaporin:	AQP-Z	AQP-Z	AQP-Z	/	AQP-Z
Poređenje:	H18>M2	H18>M7	H18>PD	H18>CD	H18>C
Akvaporin:	AQP-Y	AQP-Y	/	AQP-Y	AQP-Y

5.3. Rezultati analize EST sekvenci kod *Cryptopygus antarcticus*

Sekvencirano je ukupno 2016 cDNK klonova, iz pet cDNK biblioteka: C-kontrolne, HLAĐENE, GREJANE, H i L grupe. Nakon provjere kvaliteta sekvenci i odbacivanja kraćih od 100 baznih parova ostalo je ukupno 1180 EST sekvenci (Tabela 15.) koje su poslate u dbEST bazu podataka (Boguski i sar., 1993), a pristupni broj za date sekvence je 55137170-55138349 u dbEST bazi ili FF278135-FF279314 u GeneBank bazi podataka.

Klasterovanje ovih sekvenci dalo je 777 potencijalnih gena, od čega je bilo 647 singltona i 130 klastera. Što se klastera tiče, najveći je sadržao 92 EST sekvence, a broj klastera sa 2, 3 ili više EST sekvenci dat je u Tabeli 15. Zatim je pomoću BLAST servisa anotirano 40% potencijalnih gena u Swiss-Prot i TrEMBL proteinskim bazama, dok 60% tj. 713 potencijalnih gena nije imalo sličnost ni sa jednim proteinom iz navedenih baza. Prihvaćene su samo one anotacije za koje je E parametar bio manji od $1e^{-10}$. Gensko otkriće se definiše kao količnik broja singltona i ukupnog broja EST sekvenci i iznosio je 0,55, a genska raznolikost kao količnik broja potencijalnih gena i ukupnog broja EST sekvenci koji je iznosio 0,66.

Sekvence iz dva najveća klastera su pokazala najveću sličnost sa mitohondrijalnim genima insekata, dok su manji klasteri pokazali sličnost sa genima čiji su produkti uključeni u produkciju energije (ATP sintaza, ADP/ATP translokaza, citohrom c oksidaza), i funkcionisanje skeleta (troponin).

GO Slim analiza EST sekvenci pokazala je da među klonovima dominiraju oni čije su GO anotacije vezane za metaboličku aktivnost kao npr. ćelijski proces, transport, odgovor na stimuluse, regulaciju bioloških i metaboličkih procesa (Tabela 16.).

Tabela 15. Pregled analize svih sekvenciranih cDNK klonova kao i seta cDNK klonova koji su naneti na mikroerej kod *C. antarcticus*.

	Analiza svih EST sekvenci	Analiza EST sekvenci nanetih na mikroerej
Ukupan br. sekvenciranih cDNK klonova	2016	672
Br. EST sekvenci nakon analize kvaliteta	1180	531
Br. singltona	647	308
Br. Klastera	130	62
Br. potencijalnih gena	777	370
Prosečan br. EST sekvenci po klasteru	4,1	3,6
Najveći br. EST sekvenci u klasteru	92	71
Br. Klastera sa 2 EST sekvence	85	40
Br. Klastera sa 3 EST sekvence	19	15
Br. Klastera sa 4-5 EST sekvence	12	5
Br. Klastera sa 6-10 EST sekvenci	9	1
Br. Klastera sa >10 EST sekvenci	5	1
Gensko otkriće (eng. <i>Gene Discovery</i>)	0,55	0,58
Genska raznolikost (eng. <i>Gene Diversity</i>)	0,66	0,7
Br. potencijalnih gena sa pogotkom u Swiss-Prot bazi	397 (34%)	181 (34%)
Br. potencijalnih gena sa pogotkom u TrEMBL bazi	462 (39%)	214 (40%)
Br. potencijalnih gena bez pogotka u Swiss-Prot i TrEMBL bazama	713 (60%)	315 (59%)

Tabela 16. GO Slim analiza svih EST sekvenci kod *C. antarcticus*. F se odnosi na biološku funkciju, a P na biološki proces.

GO identifikacija	GO kategorija	GO anotacija	Br. klonova
GO:0003774	F	Motorna aktivnost	11
GO:0016874	F	Ligazna aktivnost	22
GO:0005515	F	Protein vezujuća funkcija	307
GO:0016787	F	Hidrolazna aktivnost	147
GO:0045182	F	Aktivnost u regulaciji translacije	19
GO:0004871	F	Aktivnost u transdukciji signala	10
GO:0015267	F	Transportna aktivnost vezana za kanal ili poru	8
GO:0003824	F	Katalitička aktivnost	63
GO:0005488	F	Vezujuća funkcija	299
GO:0016740	F	Transferazna aktivnost	85
GO:0005215	F	Transportna aktivnost	39
GO:0008565	F	Protein transportna aktivnost	6
GO:0015075	F	Jon transportna aktivnost	79
GO:0030528	F	Aktivnost u regulaciji transkripcije	37
GO:0004386	F	Helikazna aktivnost	11
GO:0016209	F	Antioksidativna aktivnost	2
GO:0016829	F	Liazna aktivnost	15
GO:0016491	F	Oksidoreduktazna aktivnost	98
GO:0004872	F	Receptorska aktivnost	27
GO:0016853	F	Izomerazna aktivnost	15
GO:0030234	F	Aktivnost u regulaciji enzima	16
GO:0005198	F	Aktivnost strukturnog molekula	103
GO:0009058	P	Biosintetski proces	4
GO:0050896	P	Odgovor na stimulus	149
GO:0030154	P	Ćelijska diferencijacija	97
GO:0008152	P	Metabolički proces	138
GO:0007275	P	Razviće višecelijskog organizma	126
GO:0009987	P	Ćelijski proces	278
GO:0009405	P	Patogeneza	1
GO:0046903	P	Sekrecija	34
GO:0006810	P	Transport	151
GO:0050789	P	Regulacija biološkog procesa	140
GO:0009056	P	Katabolički proces	9

5.4. Rezultati analize mikroereja kod *Cryptopygus antarcticus*

Na mikroerej je naneto 672 cDNK, od kojih je nakon analize kvaliteta sekvenci dobijeno 531 EST sekvenca (Tabela 15.). Rezultati analize EST sekvenci nanetih na mikroerej bili su veoma slični rezultatima analize svih EST sekvenci. Klasterovanje je dalo 370 potencijalnih gena, od čega je bilo 308 singltona i 62 klastera sa dve ili više sekvenci. Oko 40% potencijalnih gena je anotirano pomoću BLAST servisa u Swiss-Prot i TrEMBL bazama. Genska raznolikost je iznosila 0,7, a gensko otkriće 0,58. Najveći klaster, sa 71 EST sekvencom pokazao je sličnost sa mitohondrijalnim sekvencama džinovske kolebole, a drugi po redu po veličini, sa 7 EST sekvenci sličnost sa ADP/ATP translokazom.

Sa ciljem da se prati promena ekspresije gena, na mikroerej je hibridizovana cDNK iz dve grupe eksperimentalnih životinja H-(eng. *High Group*) – kod kojih je tačka superhlađenja bila iznad -15°C i L-(eng. *Low Group*) - kod kojih je tačka superhlađenja bila iznad -15°C, svaka zajedno sa cDNK iz kontrolne grupe životinja.

Analizom ekspresije gena utvrđeno je da je 29 klonova imalo statistički značajno povećanu ekspresiju u L grupi u poređenju sa kontrolnom. Ti klonovi pripadaju različitim klasterima pa samim tim predstavljaju 29 potencijalnih gena. Na osnovu sličnosti sa proteinima u bazama podataka bilo je moguće predvideti funkciju 11 gena (Tabela 17.), dok 18 nije bilo moguće identifikovati. U tabeli se vidi da među anotacijama dominiraju kutikularni proteini i proteini povezani sa egzoskeletom.

U H grupi u poređenju sa kontrolnom identifikovano je 6 klonova/potencijalnih gena koji su imali statistički značajno povećanu ekspresiju (Tabela 18.), a koji su svi anotirani pomoću baza podataka. Za oko 33% ovih gena predviđena je funkcija u respiratornom lancu i energetske metabolizmu (NADH dehidrogenaza i citohrom c oksidaza).

Nekoliko klonova/potencijalnih gena je imalo povećanu ekspresiju u obe L i H grupe u poređenju sa kontrolnom (CHK-1 homolog, NADH dehidrogenaza, sekretorni protein i protein povezan sa starenjem).

Tabela 17. Klonovi čija je ekspresija statistički značajno povećana u L grupi u poređenju sa kontrolnom grupom kod *C. antarcticus*. Ukoliko je BLAST pogodak bio potencijalni protein ili domen, specifični BLAST identifikacioni broj nije dodeljen.

Klon	BLAST identifikacioni broj i anotacija	Organizam
CR_C02P0_01E12	P82166 Kutikularni protein 19.8	<i>Locusta migratoria</i>
CR_C03P0_03F06	N/A Neokarakterisan protein koji sadrži kupin domen	razni organizmi
CR_C03P0_03D08	Q6BDT1 ATP sintaza A lanac	<i>Orthetrum triangulare melania</i>
CR_C03P0_03B02	Q0PXZ8 Potencijalni 60s kiseli ribozomalni protein	<i>Diaphorina citri</i>
CR_C03P0_03H07	Q7M497 Egzoskeletni protein HACP188	<i>Homarus americanus</i>
CR_C01P0_04A07	Q28EK6 CHK-1 homolog	<i>Xenopus tropicalis</i>
CR_C03P0_03C06	Q1HRJ5 Mitohondrijalna NADH dehidrogenaza (ubikvinon)	<i>Aedes aegypti</i>
CR_C01P0_04A03	Q09JM0 Potencijalni sekretorni protein 10 kDa	<i>Argas monolakensis</i>
CR_C02P0_02H05	Q16R87 Kutikularni protein u stadijumu lutke	<i>Aedes aegypti</i>
CR_C03P0_03F02	Q2Q1I4 Citohrom b	<i>Sclerophasma paresisense</i>
CR_C01P0_02A10	N/A Protein potencijalno povezan sa starenjem	razni organizmi

Tabela 18. Klonovi čija je ekspresija statistički značajno povećana u H grupi u poređenju sa kontrolnom grupom kod *C. antarcticus*.

Klon	BLAST identifikacioni broj i anotacija	Organizam
CR_C01P0_04A07	Q28EK6 CHK-1 homolog	<i>Xenopus tropicalis</i>
CR_C03P0_03C06	Q1HRJ5 Mitohondrijalna NADH dehidrogenaza (ubikvinon)	<i>Aedes aegypti</i>
CR_C01P0_04A03	Q09JM0 Potencijalni sekretorni protein 10 kDa	<i>Argas monolakensis</i>
CR_C03P0_03A09	Q8IS91 Serin proteaza	<i>Glossina fuscipes fuscipes</i>
CR_C01P0_02A10	N/A Protein potencijalno povezan sa starenjem	razni organizmi
CR_C04P0_01D06	Q85QR3 Citohrom c oksidaza subjedinica I	<i>Gompiocephalus hodgsoni</i>

U direktnom poređenju L i H grupe 30 klonova/potencijalnih gena je imalo statistički značajno povećanu ekspresiju u L u odnosu na H, od kojih je 13 anotirano (Tabela 19). Listom su dominirali su strukturni geni, 38% asociраниh sa kutikulom ili mišićima, a 23% uključeno u membranski transport.

Tabela 19. Klonovi čija je ekspresija statistički značajno povećana u L grupi u poređenju sa H grupom kod *C. antarcticus*.

Klon	BLAST identifikacioni broj i anotacija	Organizam
CR_C03P0_03D08	Q6BDT1 ATP sintaza A lanac	<i>Orthetrum triangulare melania</i>
CR_C02P0_01E12	P82166 Kutikularni protein 19.8	<i>Locusta migratoria</i>
CR_C02P0_02H01	Q16R87 Kutikularni protein karakterističan za stadijum lutke	<i>Aedes aegypti</i>
CR_C03P0_03B06	A7UKR5 Sorbitol dehidrogenaza	<i>Pyrrhocoris apterus</i>
CR_C03P0_03F05	Q0PWT7 Potencijalni elongacioni factor 1- α	<i>Diaphorina citri</i>
CR_C03P0_03E06	Q95V16 Kutikularni protein	<i>Myzus persicae</i>
CR_C01P0_02C04	QPPH7 Potencijalni tropomiozin	<i>Homalodisca coagulata</i>
CR_C01P0_04G05	Q1HR73 GTP-vezujući ADP-ribozilacioni factor Arf1	<i>Aedes aegypti</i>
CR_C01P0_02G05	Q16TR9 Na/K zavisna ATPaza β -2 subjedinica	<i>Aedes aegypti</i>
CR_C03P0_02F06	Q9B2J1 Citohrom c oksidaza polipeptid III	<i>Chrysomya putoria</i>
CR_C04P0_01B04	Q175J8 Inhibitor apoptoze 1, diap 1	<i>Aedes aegypti</i>
CR_C02P0_02E02	A4D010 β aktin	<i>Loligo pealeii</i>
CR_C03P0_02D10	O96696 Katjon transportna ATP-aza	<i>Heliothis virescens</i>

Proporcionalnim testom izdvojene su GO anotacije koje su statistički značajno više prisutne u jednoj grupi u poređenju sa drugom. Kutikularni proteini su bili karakteristični za L grupu u poređenju sa kontrolnom, a protein kinazna aktivnost za H grupu u poređenju sa kontrolnom (Tabela 20.). Kada su upoređene GO anotacije L i H grupe u L grupi su opet dominirali kutikularni proteini i hidrolazna aktivnost. Kada je H grupa upoređena sa L nije bilo značajnih rezultata.

Tabela 20. Poređenje prisutnosti GO anotacija između različitih grupa kod *C. antarcticus*. Prikazane su statistički značajno više prisutne anotacije (biološka funkcija) u L i H grupi u poređenju sa C, kao i u L grupi u poređenju sa H.

	GO identifikacija	GO anotacija
L grupa u poređenju sa C	GO:0008011	Strukturni konstituent kutikule (stadijum lutke)
	GO:0042302	Strukturni konstituent kutikule
H grupa u poređenju sa C	GO:0004674	Protein serin/treonin kinazna aktivnost
	GO:0004672	Protein kinazna aktivnost
L grupa u poređenju sa H	GO:0042302	Strukturni konstituent kutikule
	GO:0016820	Hidrolazna aktivnost

6. Diskusija

U ovom radu započeta je karakterizacija genoma dve vrste polarnih kolembola *Onychiurus arcticus* i *Cryptopygus antarcticus*, sa ciljem da se ispituju molekularne osnove otpornosti na niske temperature. Generisano je 16379 EST sekvenci za *O. arcticus* i 1180 za *C. antarcticus*, koje su poslate u baze podataka u kojima do objavljivanja ovih rezultata nije bilo nikakvih informacija o genomu ove dve vrste.

Karakteristično za obe analizirane vrste je da prilikom identifikacije EST klonova prevođenjem u proteinsku sekvencu i poređenjem sa proteinima iz dve baze Swiss-Prot i TrEMBL, oko 60% klonova nije pokazalo statistički značajnu sličnost sa proteinima iz navedenih baza, te ih nije bilo moguće identifikovati niti im pripisati moguću funkciju (Tabele 3. i 15.). Ovako nizak nivo genske identifikacije nije iznenađujući kada se radi sa ne-model organizmima, a nedavno generisane EST sekvence kod kolembola *Falsomia candida* su imale sličan nivo BLAST identifikacija (Timmermans i sar., 2007).

Glavni razlog za ovo je relativno mali broj sekvenciranih genoma insekata. Tri glavne vrste insekata u Ensembl bazi podataka (www.ensembl.org/index.html) su *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae* i *Aedes aegypti* koji su sa *O. arcticus* povezani tek na nivou subfiluma (Hexapoda). Iako je genom *D. melanogaster* u potpunosti sekvenciran još 2000 godine (Adams i sar., 2000), do sada je u Ensembl bazi podataka okarakterisano 33,8% protein kodirajućih gena. Ova brojka se značajno smanjuje kada se pogledaju podaci za kasnije sekvencirane vrste *A. gambiae* i *A. aegypti* (10,5% i 4,9% okarakterisanih protein kodirajućih gena).

Dodatan problem predstavlja činjenica da većina podataka u bazama potiče od kičmenjaka, a naglasak je uvek na podacima koji bi mogli imati značaj u medicinskim istraživanjima. Iz tog razloga funkcija gena u ne-model organizmima se najčešće može pretpostaviti analogijom, na osnovu kičmenjačkih sekvenci ili direktnom analizom sličnosti sekvenci. Naravno, ovo je jedino moguće ukoliko su geni visoko konzervisani, što veoma često nije slučaj. Dodatan problem predstavljaju sekvence koje pokazuju veliku sličnost, a da im funkcionalnost nije konzervisana (na primer kalcitonin kod sisara i riba) (Clark i sar., 2002).

6.1. *Onychiurus arcticus*

Promene u metabolizmu imaju značajnu ulogu kako u sticanju otpornosti insekata na niske temperature, tako i tokom preživljavanja na niskim temperaturama, pri čemu dolazi do potpunog gašenja procesa koji nisu neophodni, a do parcijalnog ili potpunog održavanja procesa kritičnih za preživljavanje (Storey i Storey, 2007).

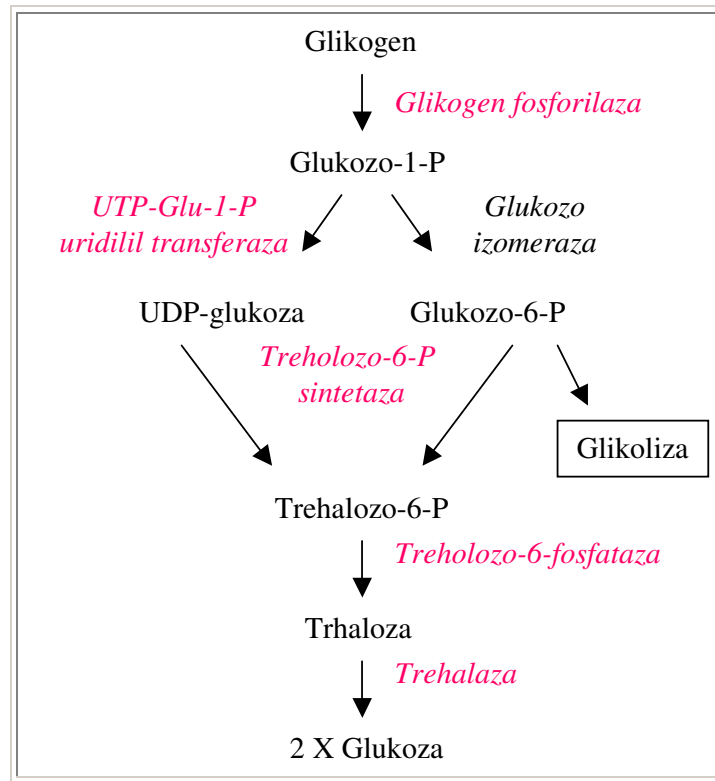
O. arcticus koristi strategiju koja je nazvana krioprotektivna dehidracija za preživljavanje na niskim temperaturama. Tokom ovog procesa voda se gubi iz organizma zbog postojanja difuzionog gradijenta između superohlađenih telesnih tečnosti i leda u okruženju, obezbeđujući da temperatura mržnjenja bude uvek niža od temperature u spoljašnjoj sredini. Kada se uspostavi ravnoteža u pritiscima vodene pare, gubitak vode prestaje, a rizik od formiranja leda u tkivima je eliminisan i preživljavanje na temperaturama ispod nule je obezbeđeno (Worland, 1996; Holmstrup and Westh, 1994).

Trehaloza kao glavni krio/anhidroprotektant kod *O. arcticus*

Dobro je dokumentovano da paralelno sa gubitkom vode kod *O. arcticus* dolazi i do brze akumulacije trehaloze (Worland i sar., 1998). Trehaloza je neredukujući šećer, koji se tokom dehidracije sintetiše od glikogena (Avonce i sar., 2006) i smatra se da je to hormonski regulisano (Steele, 1961). Sintetiše se od glukozo-6-fosfata i uridin difosfat glukoze u procesu koji se sastoji od dva koraka, a reciklira se do glukoze uz pomoć enzima trehalaze (Šema 4.). Važno je da kao neredukujući šećer ona ne izaziva oštećenja u ćeliji čak ni pri visokim koncentracijama, kakve se javljaju prilikom dehidracije (treba imati na umu da gubitak vode dodatno povećava njenu koncentraciju). Trehaloza ima nisku tendenciju kristalizacije što je veoma bitno, osobito pri dehidraciji indukovanoj zamrzavanjem. Kod *O. arcticus* trehaloza ima dvostruku ulogu. Kao prvo, njena povećana koncentracija koligativnim efektom snižava tačku mržnjenja tako da se povećava kapacitet superhlađenja i štite telesne tečnosti od zamrzavanja u okviru normalnih zimskih temperatura (Duman i sar., 1995; Zachariassen, 1985). Kao drugo, ona ima specifičnu funkciju u stabilizaciji strukture membranskog dvosloja, proteina i drugih makromolekula tokom dehidracije, a smatra se da to ostvaruje formiranjem vodoničnih veza hidroksilnih grupa sa polarnim glavama membranskih lipida ili polarnim bočnim ostacima aminokiselina (Crowe i sar., 1987; Rudolph i Crowe, 1985). Ona

efikasno sprečava i štetnu oksidaciju proteina i nezasićenih masnih kiselina u toku dehidracije (Oku i sar., 2003). Pored insekata, trehaloza je pronađena kod velikog broja organizama, bakterija, mikroorganizama, biljaka, i drugih beskičmenjaka, ali za sada ne i kod sisara (Benaroudj i sar., 2001). Ima ulogu da stabilizuje proteine i biološke membrane u uslovima različitog stresa uključujući: izlaganje visokim ili niskim temperaturama, izlaganje toksinima, gubitku vode, gladovanje, osmotski ili oksidativni stres (Crowe i sar., 1984; Benaroudj i sar., 2001).

Rezultati ovog rada na nivou gena potvrđuju da tokom dehidracije dolazi do sinteze trehaloze. Prilikom analize EST sekvenci, u svih pet biblioteka identifikovano je ukupno 44 cDNK klona koji su imali GO anotacije vezane za metabolizam trehaloze (Tabela 4.), a analizom njihovih BLAST pogodaka utvrđeno je da oni kodiraju enzime koji su na Šemi 4. na kojoj je prikazan biohemijski put sinteze i razgradnje trehaloze obeleženi crvenom bojom. Zanimljivo je da ni jedan klon vezan za trehalaznu aktivnost nije identifikovan u biblioteci kontrolnih kolembola, a najveći broj klonova vezanih za sintezu trehaloze je identifikovan u bibliotekama dobijenim od parcijalno i potpuno dehidratisanih životinja. Ovakvi rezultati su i očekivani, jer biohemijske analize pokazuju da trehaloza nije prisutna kod kontrolnih kolembola, već se sintetiše kao odgovor na proces dehidracije (Tabela 4.) (Worland i sar., 1998). Mikroerej analizom je utvrđeno da su geni uključeni u biosintezu trehaloze imali statistički značajno povećanu ekspresiju u svim dehidratisanim eksperimentalnim grupama, M2, M7, PD i CD u poređenju sa kontrolom (Tabele 9.-12.), a ne i u grupi H18 sa rehidratisanim kolembolama (Tabela 13.). Potencijalni gen za trehalozo-6-fosfat sintazu 1 imao je povećanu ekspresiju u M2, M7, PD i CD grupama a gen za UDP-glukoza pirofosforilazu (ili UTP-glukoza 1 fosfat uridiltransferazu) je imao povećanu ekspresiju u M2, M7 i PD grupama u poređenju sa kontrolom.



Šema 4. Biohemijski put sinteze i razgradnje trehaloze do glukoze. Među generisanim EST sekvencama identifikovani su geni koji kodiraju enzime koji su obeleženi crvenom bojom.

Smatra se da je glukoza-6-fosfat molekul koji predstavlja raskrnicu metabolizma ugljenih hidrata. On može biti preveden u glukoza ili u glikogen, koristi se za sintezu trehaloza-6-fosfata, može da uđe u proces glikolize ili pentozofosfatni put, a njegova sudbina zavisi od potrebe organizma. U normalnim uslovima najveći deo glukoza-6-fosfata odlazi u glikolizu da bi se dobila energija za sve životne procese. Međutim, prilikom sticanja otpornosti na niske temperature, kao i tokom različitih vidova hipometabolizma veći procenat glukoza-6-fosfata nego u normalnim uslovima se usmerava u pentozofosfatni put (Ursini i sar., 1997). Smatra se da je razlog za to prva faza ovog ciklusa u kojoj se prilikom oksidacije glukoza-6-fosfata do ribuloza-5-fosfata generiše NADPH, koji pored učešća u biosintetskim procesima, omogućava pojačanu antioksidativnu zaštitu omogućujući redukciju supstrata za antioksidativne enzime. Pored uloge u generisanju NADPH pentozofosfatni put omogućava konverziju heksoza u pentoze (koje su konstituenti biološki veoma važnih molekula) kao i uključivanje pentoza u proces glikolize.

Mikroerej analizom kod *O. arcticus* dobijeno je da su razni enzimi pentozofosfatnog puta imali povećanu ekspresiju u raznim eksperimentalnim grupama M2, M7, PD, CD i H18 (Tabele 9.-13.) u poređenju sa kontrolnom. Ovo se može objasniti činjenicom da svi ovi tretmani predstavljaju stres i da je neophodna pojačana antioksidativna zaštita, što smo takođe utvrdili analizom ekspresije gena koji kodiraju antioksidativne enzime. Takođe, moguće je pretpostaviti potencijalnu ulogu pentozoz kao osmoregulatora tokom procesa dehidracije i/ili rehidracije. Kod insekata otpornih na niske temperature pentozofosfatni put je od izuzetnog značaja, jer se u tom metaboličkom putu generišu redukcionni ekvivalenti (NADPH) neophodni za sintezu poliola (Stanić i sar., 2004).

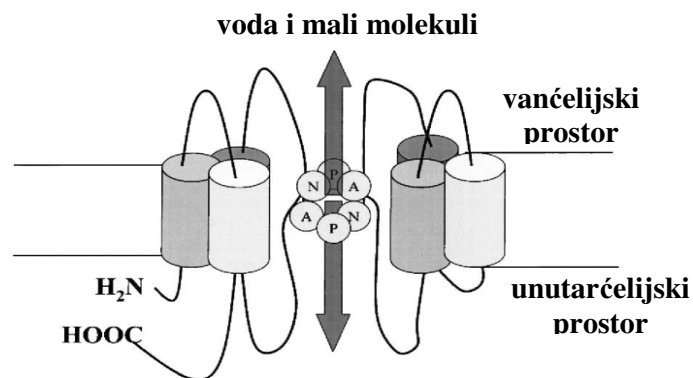
Daljom analizom utvrđena je povećana ekspresija gena za fosfoenolpiruvat karboksikinazu - enzima koji učestvuje u procesu glukoneogeneze u grupi H18 u poređenju sa kontrolom (Tabela 13.), a gena čiji proteinski produkt pokazuje najveću sličnost sa transporterom glukoze 8 – GLUT8 kod mrava *Solenopsis invicta* u grupama M2, M7 i PD u poređenju sa kontrolom (Tabele 9.-11.). Kao što je rečeno, rezultati ovog rada su potvrdili da se tokom dehidracije (bilo da je ona izazvana sniženom temperaturom ili kontrolisanom vlažnošću vazduha) sintetiše trehaloza. Moguće je pretpostaviti da nakon dehidracije, gubitak glukoze mora na neki način da se nadoknadi i da se tako može objasniti povećan nivo glukoneogeneze tokom rehidracije. Što se tiče GLUT8, ovi rezultati samo potvrđuju važnu ulogu glukoze i metabolizma ugljenih hidrata tokom sticanja otpornosti na niske temperature, kao i tokom dehidracije.

Veoma je zanimljivo da smo utvrdili i povećanje ekspresije gena čiji produkti imaju sličnost sa enzimima uključenim u glioksalatni ciklus. Poznato je da je glioksalatni ciklus prisutan kod bakterija, protista, biljaka, fungi i nematoda, ali ne i kod ostalih metazoa, a neto rezultat ovog ciklusa je produkcija glukoze od masnih kiselina.. Međutim, aktivnost enzima glioksalatnog ciklusa, malat sintaze i izocitrat liaze je potvrđena i u animalnim tkivima (Kondrashov i sar., 2006). Kod *O. arcticus* gen za izocitrat liazu imao je povećanu ekspresiju u M2, M7 i PD (Tabele 9.-11.), a gen za malat sintazu u M2 grupi u poređenju sa kontrolnom (Tabela 9.). Ove rezultate je naravno potrebno dodatno potvrditi. Kondrashov i sar., 2006, koji su analizirali distribuciju gena za malat sintazu i izocitrat liazu kod životinja, sugerišu da ti geni ili kodiraju alternativne enzime glioksalatnog ciklusa koji nisu ortologni poznatim enzimima, ili su proteini kodirani ovim genima kod životinja stekli neku novu funkciju koja još nije okarakterisana.

Akvaporini

Akvaporini su članovi velike familije membranskih proteina (eng. *Major Intrinsic Proteins – MIPs*) koji formiraju pore u biološkoim membranama. Akvaporini su poznati i kao kanali za vodu, jer formiraju pore kroz koje se vrši brz i visoko specifičan transport vode i na taj način se reguliše volumen i osmotski pritisak u ćelijama (Kruse i sar., 2006). Selektivnost za vodu u odnosu na jone se postiže elektrostatičkim potencijalom u unutrašnjosti ovih kanala koji omogućava selektivno zadržavanje svih molekula koji nose naelektrisanje kao što su joni i protoni. Neki akvaporini su poznati kao akvagliceroporini jer pored vode transportuju male nenaelektrisane molekule kao što su glicerol, CO₂, amonijak i ureu.

Prvi akvaporin, AQP1 izolovan je iz sisarskih crvenih krvnih zrnaca, a do danas je identifikovan veći broj različitih akvaporina kod raznih organizama. Akvaporini imaju šest transmembranskih alfa heliksa između kojih se nalazi pet petlji, a N i C terminalni krajevi proteina su smešteni u citoplazmi (Slika 5.). Amino i karboksilna polovina molekula pokazuju veliku sličnost u sekvenci, tako da se može reći da se akvaporini sastoje od dva tandemska ponovka od po tri transmembranska alfa heliksa. Druga i peta petlja su hidrofobne i sadrže konzervisani NPA motiv (asparagin – prolin – alanin). Dva NPA motiva se preklapaju u srednjem delu membranskog dvosloja i formiraju trodimenzionalni kanal za prolaz molekula vode. Različiti akvaporini imaju različit patern glikozilacije a većina akvaporina na jednoj od citoplazmatskih petlji sadrži konzervisani motiv za fosforilaciju protein kinazom A.



Slika 5. Šematski prikazana struktura akvaporina (Badaut i sar., 2002).

Kod *O. arcticus* su prilikom analize EST sekvenci identifikovana tri različita akvaporin gena, čiji su produkti radi lakšeg praćenja obeleženi kao AQP-X, AQP-Y i AQP-Z, a njihovo poravnanje je prikazano na Slici 4. Translatirani proteini su bili dugački oko 200 aminokiselina što je otprilike 80% očekivane dužine akvaporina. Svi klonovi su imali 5 kompletnih transmembranskih domena (obeleženi na Slici 4. crnom linijom iznad sekvence TM1-TM5), dok je šesti transmembranski domen TM6 bio prisutan samo u AQP-Y i delimično u druga dva akvaporina. Sva tri akvaporina su sadržala klasične delove akvaporina, dva NPA motiva (obeleženi na Slici 4. crvenom linijom ispod konsenzus sekvence), cistein na 181 poziciji nije bio konzervisan, a samo je AQP-Z imao konsenzus mesto za N glikozilaciju (obeleženo na Slici 4. crvenim znakom taraba iznad sekvence). Konsenzus mesto za fosforilaciju protein kinazom C nije bilo prisutno (Yang i sar., 1999). Homologija između akvaporina je bila relativno niska sa maksimalnih 49,4% aminokiselinske identičnosti (Tabela 5.), ali to nije iznenađujuće, jer je homologija između akvaporina generalno niska. Na primer, maksimalna homologija između poslednjeg identifikovanog akvaporina (AQP12) kod miša sa drugim mišjim akvaporinima je 38,9% (Itoh i sar., 2005). Kada je 328 bp dugačka sekvenca iz egzona 1, gena za akvaporin 2 poređena kod 12 sisarskih vrsta samo 14 od 109 aminokiselina su bile konzervisane. Od ovih 14 konzervisanih aminokiselina među sisarima 13 je identifikovano u akvaporinima naših uzoraka (obeležene na Slici 4. crvenim zvezdicama ispod konsenzus linije).

Promena ekspresije ova tri akvaporin gena, dobijena mikroerej analizom, prikazana je u Tabeli 14. U M7 grupi nije bilo povećane ekspresije akvaporin gena ni u odnosu na jednu eksperimentalnu grupu životinja. U M2 grupi je uočena povećana ekspresija AQP-Z samo u poređenju sa H18 grupom. U PD grupi dobijena je povećana ekspresija AQP-Y u poređenju sa CD grupom, AQP-X u poređenju sa H18 grupom, a AQP-X i AQP-Y u poređenju sa M2 grupom. Za CD eksperimentalnu grupu životinja se može reći da je karakterističan AQP-Z jer ima povećanu ekspresiju u ovoj grupi u poređenju sa svim ostalim grupama, osim kontrolne. Isto tako za H18 grupu je karakterističan AQP-Y jer ima povećanu ekspresiju u poređenju sa ostalim grupama, osim PD. Ovakvi rezultati mogu da nagoveste jednu veoma zanimljivu hipotezu, da su različiti akvaporini odgovorni za proces dehidratacije i rehidratacije, kao i da se različiti akvaporini ekspresuju u zavisnosti od toga šta je izazvalo proces dehidratacije. Naravno ovo zahteva potvrdu kako korišćenjem drugih metoda kod *O. arcticus*, tako i kod drugih organizama.

Antioksidativna zaštita ćelije

Analizirani su enzimi antioksidativne odbrane, jer je pokazano da se tokom hipometabolizma pojačava antioksidativna odbrana i/ili povećava ekspresija gena koji kodiraju antioksidativne enzime (Hermes-Lima i sar., 2001; Hermes-Lima i Zenteno-Savin, 2002; Ramos-Vasconcelos i Hermes-Lima, 2003; Storey 2006a; Storey 2007).

Identifikovan je veliki broj, 387 klonova (Tabela 6.) čije su GO anotacije bile vezane za antioksidativnu aktivnost. Interesantno je da je najveći broj klonova bio prisutan u dve dehidratirane biblioteke D1 i D2. Što se tiče prisutnosti različitih antioksidanata u različitim bibliotekama, može se zaključiti da su u svim bibliotekama u većoj meri bili prisutni klonovi čiji su produkti uključeni u sintezu glutaciona, katalaze i vodonik peroksida, dok su klonovi čiji su produkti uključeni u sintezu melanina i superoksid dismutaze bili zastupljeni u manjem broju. Rezultati analize mikroereja takođe potvrđuju povećanu ekspresiju raznih molekula uključenih u antioksidativnu zaštitu u raznim eksperimentalnim grupama (Tabele 9.-13.). Zanimljivo je uočiti da je gen koji kodira katalazu, enzim koji katališe razlaganje toksičnog vodonik peroksida do kiseonika i vode, imao povećanu ekspresiju samo u H18 grupi u poređenju sa kontrolom.

Presvlačenje insekata

Procesi koji omogućavaju preživljavanje insekata na niskim temperaturama uključuju uklanjanje ili deaktivaciju nukleatora kristalizacije leda, akumulaciju krioprotektanata i antifriz proteina (Knight i Duman, 1986; Sømme, 1982; Sømme, 1995; Zachariassen, 1992). Nedavno je kod antarktičke kolebole *C. antarcticus*, presvlačenje dovedeno u vezu sa sniženjem tačke superhlađenja i samim tim povećanom otpornošću na niske temperature (Worland, 2005; Worland i sar., 2006). Smatra se da tokom presvlačenja dolazi do sniženja tačke superhlađenja, jer prilikom odbacivanja starog intestinalnog epitela dolazi i do pražnjenja sadržaja creva čime se redukuje broj potencijalnih nukleatora leda (Thibaud, 1968). Kod *O. arcticus*, do sada nije analizirana fiziologija presvlačenja, iako pripadnost subklasi Apterygota podrazumeva odsustvo metamorfoze, ali kontinualno presvlačenje tokom celog životnog ciklusa.

Zbog toga su pomoću GO termina u bibliotekama pretraženi geni i biohemijski putevi koji su uključeni u presvlačenje. Veći broj gena je identifikovan i za juvenilni hormon i za članove puta egdizona (rezultati nisu prikazani). Zanimljivo je uočiti da je više pogodaka bilo nađeno

kod delimično dehidratisanih D1 i rehidratisanih R1 i R2 kolembola (10, 24 i 14 pogodaka respektivno), u poređenju sa samo 8 pogotka u kontrolnim, 5 u potpuno dehidratisanim populacijama. Ovo ukazuje da presvlačenje ima ulogu u procesu dehidratacije, ali da je za bolje razumevanje ove povezanosti neophodno dublje i sveobuhvatnije istraživanje.

LEA proteini

LEA proteini su heterogeni proteini male molekulske mase, najčešće između 10 i 30 kDa (Hong-Bo i sar., 2005). LEA bi u prevodu značilo "veoma prisutni proteini u kasnoj fazi embriogeneze", a što se odnosi na to da je njihova ekspresija povećana u kasnoj fazi embriogeneze semena i polena mnogih biljnih vrsta, pri čemu njihov nivo može da dostigne i do 4% suve mase (Roberts i sar., 1993). LEA proteini su pronađeni kod mnogih organizama: bakterija, algi, biljaka, rotifera, nematode, tartigrada, primitivnih račića, nekih insekata (Wise i Tunnacliffe, 2004; Kikawada i sar., 2006), ali za sada, ne i kod kičmenjaka. To su najčešće hidrofилni molekuli, neuređene sekundarne i tercijerne structure, a nalaze se i u citoplazmi i u nukleusu. Na osnovu aminokiselinske sekvence i načina ekspresije dele se u najmanje pet grupa (Hong-Bo i sar., 2005, Goyal i sar., 2005).

I pored brojnih analiza funkcija LEA proteina je ostala nejasna. Oni pokazuju strukturnu sličnost sa mnogim poznatim proteinima, a pretpostavlja se da mogu biti molekularni šaperoni, stabilizatori membrana, "hvatači i čistači" slobodnih radikala, antiagregacioni proteini ili mogu služiti kao mehanička potpora u dehidratisanoj ćeliji u vidu neke vrste citoskeleta (Wise i Tunnacliffe, 2004; Goyal i sar., 2005; Hong-Bo i sar., 2005).

Identifikacija LEA proteina je problematična iz dva razloga. Prvo, nisu konzervisani između različitih vrsta (Wise i Tunnacliffe, 2004). Na primer, kada su međusobno poređeni LEA3 proteini kod dve žitarice: kukuruza (Q42376) i pšenice (Q0398) identičnost je bila samo 53,5%, a ovo se dramatično spustilo na 27,2% između različitih filuma kao što su leblebija (O49816) i nematoda (Q95V77). Čak i segment od 11 aminokiselina koji se ponavlja i koji predstavlja karakteristiku LEA proteina, pokazao je malu konzervisanost sa samo 1 ili 2 identične aminokiseline između leblebije i nematode *Aphelenus avenae*. Drugi problem predstavlja prisustvo abhidrolaznog domena u LEA proteinima, tako da pretraživanje proteinskih baza po sličnosti često može da da pogrešne rezultate. Proteini sa abhidrolaznim domenom su velika familija proteina, imaju alfa/beta hidrolazni zavoј koji je zajednički za veliki broj hidrolitičkih enzima koji imaju različito filogenetsko poreklo i katalitičku funkciju. Smisao ove strukturne sličnosti dve navedene grupe proteina tek treba da se otkrije.

Od analiziranih gena i puteva jedino LEA proteine nije bilo moguće identifikovati pomoću GO anotacija, već su identifikovani pomoću BLAST anotacija. Dva klona su identifikovana u biblioteci D2 i jedan klon u D1, a to je upravo gde bismo i očekivali takve gene ukoliko bi oni bili uključeni u proces dehidracije. Translacijom ova tri klona i njihovim poravnanjem utvrđeno je da se radi samo o jednom genu, a poravnanje proteinskog produkta tog potencijalnog LEA gena i LEA proteina pirinča *Oryza sativa* dao je 31% identičnih aminokiselina (Slika 4.) Mikroerej analizom povećana ekspresija gena sa abhidrolaznim domenom koji predstavljaju potencijalne LEA gene je utvrđena u M2, M7 i CD grupama u poređenju sa kontrolom (Tabele 9.,10. i 12.). Ovo daje osnovu za pretpostavku da su i kod *O. arcticus* ovi proteini uključeni u preživljavanje dehidracije. Naravno ovo je nemoguće reći sa sigurnošću na osnovu kratke sekvence gena koja je poznata, već je potrebno dobiti punu dužinu sekvence gena upotrebom RACE-PCR tehnike da bi se potvrdili ovi rezultati.

Lektini

Praćena je i ekspresija gena koji kodiraju lektine. Lektini C tipa su raznolika familija ekstraćelijskih proteina koji su uključeni u brojne biološke procese. Kod *Caenorhabditis elegans* pomoću RNK interferencije je utvrđeno da geni za lektine C tipa imaju ulogu u sposobnosti nematode da preživi osmotski stres (Lamitina i Strange, 2005). Slični rezultati dobijeni su i kod nematode *Steinernema carpocapsae* (Tyson i sar., 2007). Rezultati ovog rada su u saglasnosti sa rezultatima dobijenih kod nematode, jer je utvrđeno da je gen za lektin 4 C tip imao povećanu ekspresiju u M2 i CD grupama u poređenju sa kontrolom (Tabele 9. i 12.), a to bi svakako moglo da se objasni potencijalnom ulogom u osmotskom stresu tokom dehidracije.

Kompozicija membrana

Regulacija membranske fluidnosti je posebno važna kod organizama koji ne mogu da regulišu sopstvenu temperaturu jer se hlađenjem lipidnog dvosloja smanjuje fluidnost, a ukoliko se dostigne kritična temperatura prelaza, dolazi do fazne promene pri čemu dvosloj prelazi u gel fazu. Fluidnost membrane je određena sastavom masnih kiselina i sadržajem holesterola. Sa smanjenjem dužine lanca i povećanjem broja dvostrukih veza u masnim kiselinama koje ulaze u sastav membrane, smanjuje se temperatura topljenja membrane, a samim tim sprečava se prelaz u gel fazu. Što se tiče holesterola, on ima rigidan steranski prsten koji interferira sa

pokretljivošću lanaca masnih kiselina, tako da na višim temperaturama smanjuje fluidnost, a na nižim sprečava prelaz u gel fazu.

Iako je povećanje nezasićenosti membrana dobro dokumentovan odgovor na niske temperature jer štiti membrane od fluid – gel tranzicije (Logue i sar., 2000; Hochachka i Somero, 2002; Hulbert, 2003), kod insekata ovo nije u velikoj meri analizirano. Kod leptira, *Cymbalophora pudica* je utvrđeno da dolazi do značajnih promena u sastavu membranskih lipida u mozgu i crevu kao odgovor na jednodnevnu aklimaciju na 4°C, omogućavajući da membranska fluidnost u ova dva tkiva ostane neizmenjena. Dodatno, stepen lipidne desaturacije se blago povećao u masnom tkivu, pljuvačnim žlezdama i telesnom zidu. Pošto ovaj leptir nema izrazitu otpornost na niske temperature čak ni nakon aklimacije, smatra se da su ovakve umerene promene u kompoziciji lipida uobičajene (Simek i sar., 1998). Kod vrste *Drosophila melanogaster*, utvrđeno je da su brze promene u otpornosti na niske temperature povezane sa promenama u kompoziciji membranskih fosfolipidnih masnih kiselina i povećanjem membranske nezasićenosti (Overgaard i sar., 2005).

Slični rezultati potvrđeni su i kod *O. arcticus*. Statistički značajno povećana ekspresija gena za desaturaze, enzima koji uvode dvostruke veze u masne kiseline i na taj način im snižavaju tačku topljenja, dobijena je u tri dehidratirane grupe eksperimentalnih životinja. Gen za acil-CoA desaturazu bio je statistički značajno povećan u M2 i M7 (Tabele 9. i 10.), a gen za sfingolipid delta 4 desaturazu u M7 i CD grupama u poređenju sa kontrolom (Tabele 10. i 12.).

Proteini toplotnog stresa - Hsps

Zajednički odgovor na mnoge vrste stresa je povećana sinteza i aktivnost Hsps koji imaju za cilj da "poprave" oštećene proteine ili pomognu njihovo uklanjanje. Analiza ekspresije Hsps nakon izlaganja hladnom šoku kod *Sarcophaga crassipalpis* (Rinehart i sar., 2000; Rinehart i Denlinger, 2000; Yocum i sar., 1998), četiri vrste roda *Drosophila* (Hoffmann i sar., 2003; Goto i Kimura, 1998) i *Leptinotarsa decemlineata* (Yocum, 2001), pokazala je da hsp transkripti imaju povećanu ekspresiju 1–12h nakon prestanka izlaganja niskoj temperaturi.

Najčešće je analiziran gen koji kodira inducibilnu formu proteina toplotnog stresa Hsp70. Protein Hsp70 je visoko konzervisan među različitim grupama organizama (sličnost >50%), i eksprimiran je nakon izlaganja hladnom šoku kod svih šest navedenih vrsta insekata. Hsp70 pomaže u preživljavanju stresa tako što omogućava ponovno savijanje oštećenih proteina,

omogućava ponovno rastvaranje nerastvornih proteina (Lindquist, 1986) i obeležava proteine za degradaciju (Terlecky i sar., 1992). Jači hladni šok indukuje jaču i dužu indukciju hsp70 transkripta kod *Sarcophaga crassipalpis*, ali ta indukcija započinje nešto kasnije nego indukcija uzrokovana umerenim hladnim šokom (Rinehart i sar., 2000).

Iako kao konstitutivni protein toplotnog stresa Hsc70 normalno ne menja svoj ekspresioni profil u odgovoru na stres, kod *Sarcophaga crassipalpis* je utvrđeno da hsc70 transkripti imaju povećanu ekspresiju kao odgovor na hladni šok (Rinehart i sar., 2000). Hsc70 ima veoma važnu ulogu u aktivaciji transkripcionog faktora HSF (eng. *Heat Shock Factor – HSF*) koji se vezuje za HSE elemente (eng. *Heat Shock Element – HSE*) koji se nalaze u promotoru mnogih hsp gena (Denlinger i sar., 2001), međutim povećana ekspresija gena za Hsc70 nakod hladnog šoka ostaje nerazjašnjena.

Proteni toplotnog stresa niske molekulske mase formiraju veoma heterogenu grupu proteina, molekulske mase 12 – 40 kDa, sa veoma ograničenom sličnošću sekvence među različitim grupama organizama. Kod vrste *Drosophila melanogaster* su identifikovane četiri grupe proteina toplotnog stresa male molekulske mase. Njihova uloga u odgovoru na stres uključuje ponovno savijanje lokalnih domena oštećenih proteina u cilju zadobijanja odgovarajuće konformacije, obeležavanje aberantnih proteina u ranim stadijumima denaturacije, što omogućava drugim šaperonima da ih prepoznaju i omoguće im uspostavljanje odgovarajuće konformacije i inhibiciju proteolize (Denlinger i sar., 2001; Feder i Hofmann, 1999). Takođe su efektivni u očuvanju aktinskog citoskeleta prilikom hipotermije kod sisara, što je izuzetno važna funkcija kod otpornosti na hladnoću, jer je poznato da pri izlaganju niskim temperaturama dolazi do narušavanja strukture citoskeleta *in vitro* (Job i sar., 1982; Russotti i sar., 1997). Pokazano je da mali proteini toplotnog stresa štite membrane povećavajući fluidnost lipida koji imaju visoku tačku topljenja (Tsvetkova i sar., 2002). Kod *Sarcophaga crassipalpis*, hsp23 transkript je imao povećanu ekspresiju kao odgovor na izlaganje niskim temperaturama, visokim temperaturama i tokom dijapauze (Joplin i sar., 1990; Yocum i sar., 1998). Takođe kod *Sarcophaga crassipalpis*, RNK interferencija hsp23 transkripta dovela je do značajne redukcije u preživljavanju hladnog šoka, za razliku od RNK interferencije hsp70 transkripta koja je imala veoma malo efekta na preživljavanje niskih temperatura, ostavljajući povećanu ekspresiju Hsp70 tokom brzog sticanja otpornosti na niske temperature neobjašnjenu (Michlaud i Denlinger, 2004; Chown i Storey, 2006).

Pripadnici 90 kDa familije proteina toplotnog stresa kod *Sarcophaga crassipalpis* takođe imaju povećanu ekspresiju u odgovor na hladni šok (Joplin i sar., 1990), ali ne i tokom dijapauze (Rinehart i Denlinger, 2000). Normalno, hsp90 transkripti su konstitutivno

ekspimirani u maloj meri, a dodatna indukcija se dešava 1h nakon hladnog šoka, dostiže pik 4h nakon hladnog šoka a ostaju ekspimirani u velikoj meri čak i nakon 12h (Rinehart i Denlinger, 2000). Proteini toplotnog stresa Hsp90 prepoznaju i "popravljaju" oštećene proteine za koje su vezani Hsc70, a kao posledica toga oslobađa se HSF i obeležavaju proteine za degradaciju u ubikvitin zavisnom putu u proteazomima (Young i sar., 2001).

Mikroerej analizom kod *O. arcticus* pokazana je povećana ekspresija tri različita mala proteina toplotnog stresa (potencijalni mali protein toplotnog stresa, proteini toplotnog stresa 20,7 i 19,9) u raznim dehidratisanim eksperimentalnim grupama osim u CD u poređenju sa kontrolom (Tabele 9.-12.). U eksperimentalnoj grupi rehidratisanih kolembola H18, utvrđena je povećana ekspresija tri potencijalno različita Hps70 proteina u poređenju sa kontrolom (Tabela 13.), od kojih su dva konstitutivno prisutna i jedan inducibilni. Ovi rezultati sugerišu da su kod ove vrste mali proteini toplotnog stresa uključeni u "popravku" i uklanjanje oštećenih proteina tokom procesa dehidracije, a prilikom oporavka od tog šoka tj. tokom rehidracije aktivira se familija Hsp70.

Dehidracija izazvana niskom tempeturom ili kontrolisanom vlažnošću vazduha – budući rad

Veoma je zanimljivo postaviti pitanje čiji odgovor prevazilazi okvire ovog rada: da li organizmi na isti način preživljavaju dehidraciju izazvanu izlaganjem niskoj temperature i dehidraciju izazvanu kontrolisanom vlažnošću vazduha (u odsusutvu niske temperature)? Da li su molekularni mehanizmi otpornosti organizma na ove dve različito izazvane dehidracije identični, slični i u kojoj meri, ili različiti. Odgovor na ovo pitanje bi se mogao dobiti poređenjem tretmana PD i CD sa jedne strane i M2 i M7 sa druge strane i to će svakako biti jedan od budućih pravaca istraživanja.

6.2. *Cryptopygus antarcticus*

C. antarcticus je vrsta koja ne toleriše zamrzavanje i koju karakterišu nedovoljno razjašnjena bimodalna distribucija tačke superhlađenja kao i brze promene tačke superhlađenja u odgovoru na spoljašnje stimulse. I pored navedenih poteškoća u identifikaciji EST sekvenci i konstrukcije veoma malog mikroereja, eksperiment je pružio dovoljno rezultata da se izvedu neki zaključci o prirodi tolerancije na niske temperature kolembola *C. antarcticus* sakupljenih tokom letnjih meseci (Tabele 17.-20.). Veći broj gena je imao povećanu ekspresiju i u H grupi (kolebole kod kojih je tačka superhlađenja bila iznad -15°C) i u L gupi (kolebole kod kojih je tačka superhlađenja ispod -15°C), što ukazuje da su obe grupe metabolički aktivne, međutim relativan doprinos različitih potencijalnih gena ovim grupama ukazuje na njihove različitosti.

U H grupi statistički značajno povećanu ekspresiju u poređenju sa kontrolnom grupom su pokazali geni za čije je produkte predviđena funkcija u respiratornom lancu i energetskom metabolizmu (NADH dehidrogenaza, citohrom c oksidaza), kao i CHK-1 homolog koji je uključen u kontrolu ćelijskog ciklusa (Tabela 18.). Ukoliko kombinujemo ove rezultate sa rezultatima koji markiraju serin/treonin protein kinazu koja je uključena u ćelijski signaling, kao proporcionalno povećanu GO anotaciju u H grupi (Tabela 20.) možemo zaključiti da rezultati ukazuju na visok nivo metaboličke aktivnosti u ovoj grupi eksperimentalnih životinja. To je u saglasnosti sa dosadašnjim znanjem i razumevanjem da se H grupa sastoji od jedinki koje aktivno rastu i reprodukuju se, u periodu koji karakteriše povećana potreba za hranom i energijom.

Među genima koji su pokazali statistički značajnu povećanu ekspresiju u L gupi u poređenju sa kontrolnom, kao i u poređenju sa H grupom dominirali su kutikularni proteini (Tabele 17. i 19.), a ti rezultati se poklapaju i sa analizom proporcionalno povećanih GO anotacija (Tabela 20.). Takođe u ovoj grupi identifikovani su geni koji imaju pretpostavljenu funkciju u membranskom transportu, što bi moglo da se poveže sa sekrecijom i produkcijom nove kutikule.

Zanimljivo, jedan od potencijalnih gena identifikovan u L grupi bio je 10 kDa sekretorni protein izolovan iz pljuvačnih žlezda krpelja *Argas monolakensis* u okviru proteom projekta, a

čija je funkcija nepoznata (Mans i sar., 2008). Još jedan zanimljiv klon iz L grupe je pokazao sličnost sa kupin superfamilijom proteina. Ovo je velika grupa proteina koja ima širi opseg biohemijskih funkcija nego i jedna superfamilija opisana do danas. Funkcija je vezana za izomeraznu i epimeraznu aktivnost, uključena u modifikaciju ugljenih hidrata ćelijskog zida bakterija, ne-enzimsko skladištenje proteinima u semenima biljaka i transkripcioni faktor povezan sa urođenom ćelavošću sisara (Dunwell i sar., 2001). Stoga ovaj transkript predstavlja zanimljivog kandidata za buduće studije, obzirom da bi mogao da ima i neku funkciju koju nije moguće predvideti.

Šire gledano, rezultati ovih istraživanja su u korelaciji sa skorašnjim istraživanjima kod kolembola (Worland, 2005; Worland i sar., 2006) koja ukazuju na činjenicu da bi presvlačenje mogao biti proces tokom kog se snižava tačka superhlađenja. Period pre presvlačenja kod kolembola karakteriše period gladovanja tokom kog se formira novi intestinalni epitel. Epikutikula i ekgzokutikula se sintetišu, a neposredno pre presvlačenja stari intestinalni epitel se odbacuje (Humbert, 1979). Ovaj proces bi mogao da uključi kompletno pražnjenje sadržaja creva, a samim tim da snizi tačku superhlađenja, jer se redukuje broj potencijalnih nukleatora leda. Kolebole se presvlače tokom čitavog života, broj presvlačenja varira od 4 do više od 50 (Christiansen, 1990), a u bilo kom momentu presvlači se oko 40% populacije (Leinaas, 1983). Zbog toga presvlačenje i periodi gladovanja obuhvataju značajan procenat juvenilnih i adultnih formi, i potencijalno imaju jak modifikacioni efekat na sposobnost superhlađenja u letnjim mesecima, kada su naši uzorci sakupljeni.

Naši rezultati mikroereja za *C. antarcticus* pružaju dokaze da postoji razlika u genskoj ekspresiji između H i L grupe eksperimentalnih životinja. Rezultati podržavaju teoriju da varijacije u tački superhlađenja mogu nastati kao posledica endogenih fizioloških procesa tokom presvlačenja. Ova analiza je pružila osnovu za dalje, detaljnije analize, kao što su produkcija obimnijih cDNK biblioteka i mikroereja velike gustine, što će obezbediti bolji uvid u adaptacije ove vrste na ekstremne uslove spoljašnje sredine.

Interpretirajući rezultate na ovaj način, veoma je važno naglasiti da i kod *Onychiurus arcticus* i kod *Cryptopygus antarcticus* fiziološki važan efekat mogu da imaju promene u genskoj ekspresiji gena koje u ovim analizama nisu odabrane kao statistički značajne (nivo značajnosti je bio 0,01). Da bi se detektovale i ove manje značajne promene u genskoj ekspresiji potrebne su obimnije analize. Takođe potrebno je naglasiti da promene u transkripcionom nivou iRNK

ne ukazuju uvek na promene na proteinskom nivou, međutim one predstavljaju indikator ćelijskih procesa koji su izazvani eksperimentalnim uslovima koji se analiziraju. Posebno treba naglasiti da veliki procenat (oko 50%) potencijalnih gena nisu imali slične sekvence u bazama podataka. Moguće je da neki od njih predstavljaju kritične gene u biohemijskim procesima karakterističnim za ispitivane eksperimentalne grupe, međutim detaljnije analize, kao i dobijanje sekvenci pune dužine su neophodni za potencijalnu identifikaciju domena i dodeljivanje funkcije.

7. Zaključci

Rad je obuhvatio čitav niz molekularno-bioloških i biohemijskih metoda sa ciljem da dobijeni rezultati doprinesu opštim zaključcima o genskoj ekspresiji, molekularnim i biohemijskim mehanizmima otpornosti na niske temperature kod dve vrste polarnih kolembola, a i generalno kod unsekata uopšte.

Generisano je 16379 EST sekvenci za *Onychiurus arcticus* i 1180 za *Cryptopygus antarcticus*, koje su poslate u javne baze podataka u kojima do objavljivanja ovih rezultata nije bilo nikakvih informacija o genomu ove dve vrste. Ovi podaci su sada dostupni i oni će obezbediti značajnu osnovu za komparativne genomske analize ne samo vrsta iz polarnih predela. Konstruisani su mikroereji, za *O. arcticus* štampanjem 6912 cDNK u duplikatu, a za *C. antarcticus* štampanjem 672 cDNK u duplikatu. Na osnovu analize mikroerej rezultata i EST sekvenci, odgovarajućim statističkim programima, izvedeni su sledeći zaključci:

Onychiurus arcticus - za preživljavanje na niskim temperaturama koristi strategiju poznatu kao krioprotektivna dehidracija, proces tokom kog dolazi do gubitka značajne količine vode iz organizma. Paralelno sa gubitkom vode dolazi do brze sinteze trehaloze, kao krio/anhidroprotektanta.

- Analizom EST sekvenci najveći broj klonova vezanih za sintezu trehaloze je identifikovan u bibliotekama dobijenim od parcijalno i potpuno dehidratisanih jedinki. Mikroerej analizom je utvrđeno da su geni uključeni u biosintezu trehaloze imali statistički značajno povećanu ekspresiju u svim dehidratisanim eksperimentalnim grupama, M2, M7 (delimično i potpuno dehidratisane hlađenjem do -2 tj. -7°C), PD i CD (delimično i potpuno dehidratisane u uslovima konstantne relativne vlažnosti vazduha) u poređenju sa kontrolom, a ne i u grupi rehidratisanih kolembolama (H18). Ovi rezultati genske aktivnosti potvrđuju da se trehaloza kao krio/anhidroprotektant sintetiše tokom procesa dehidracije.
- Mikroerej analizom utvrđeno je da su razni enzimi pentozofosfatnog puta imali povećanu ekspresiju u raznim eksperimentalnim grupama M2, M7, PD, CD i H18 u poređenju sa kontrolnom. Ovo je u skladu sa utvrđenim značajem pentozofosfatnog puta u otpornosti insekata na niske temperature, a može se objasniti činjenicom da svi ovi tretmani predstavljaju stres i da je neophodna pojačana produkcija NADPH koja

omogućava pojačanu antioksidativnu zaštitu, a moguće je i pretpostaviti potencijalnu ulogu pentoza kao osmoregulatora tokom procesa dehidracije i/ili rehidracije.

- Utvrđena je povećana ekspresija gena za fosfoenolpiruvat karboksikinazu - enzima koji učestvuje u procesu glukoneogeneze i to samo u grupi H18, što ukazuje na neophodnost resinteze glukoze tokom rehidracije.
- Utvrđena je povećana ekspresija gena za transporter glukoze 8 – GLUT8 u grupama M2, M7 i PD u poređenju sa kontrolom i time potvrđena važna uloga glukoze i metabolizma ugljenih hidrata u procesu krioprotektivne dehidracije.
- Gen za izocitrat liazu imao je povećanu ekspresiju u M2, M7 i PD, a gen za malat sintazu u M2 grupi u poređenju sa kontrolnom. Na osnovu analize distribucije gena za malat sintazu i izocitrat liazu kod životinja, moguće je pretpostaviti da ti geni ili kodiraju alternativne enzime glioksalatnog ciklusa koji nisu ortologi poznatim enzimima, ili su proteini kodirani ovim genima kod životinja stekli neku novu funkciju koja još nije okarakterisana.
- Prilikom analize EST sekvenci identifikovana su tri različita akvaporin gena, a praćenje njihove ekspresije u pet različitih eksperimentalnih grupa nagovestilo je veoma zanimljivu hipotezu: da su različiti akvaporini odgovorni za procese dehidracije i rehidracije, kao i da se različiti akvaporini ekspimiraju u zavisnosti od uzroka dehidracije (niske temperature ili eksperimentalni uslovi).
- Utvrđena je povećana ekspresija gena antioksidativne zaštite u raznim eksperimentalnim grupama u poređenju sa kontrolom što ukazuje na činjenicu da je antioksidativna zaštita deo procesa dehidracije i rehidracije.
- Analizom GO termina vezanih za presvlačenje identifikovan je veći broj gena, a zanimljivo je uočiti da je više pogodaka bilo nađeno kod delimično dehidratiranih D1 i rehidratiranih R1 i R2 kolembola nego u kontrolnim i potpuno dehidratiranim populacijama. Ovo ukazuje da presvlačenje možda ima ulogu u procesu dehidracije ili da je kod nekih jedinki ono potencijalno izazvano stresom koji prati proces dehidracije i rehidracije.

- Mikroerej analizom utvrđena je povećana ekspresija potencijalnih LEA gena u M2, M7 i CD grupama u poređenju sa kontrolom, što daje osnovu za pretpostavku da su i kod *O. arcticus* ovi proteini uključeni u preživljavanje dehidracije.
- Gen za lektin 4 C tip je imao povećanu ekspresiju u M2 i CD grupama u poređenju sa kontrolom, a to bi moglo da se objasni potencijalnom ulogom ovog proteina u osmotskom stresu tokom dehidracije.
- Statistički značajno povećana ekspresija gena za desaturaze, enzima koji uvode dvostruke veze u masne kiseline i na taj način im snižavaju tačku topljenja, dobijena je u tri dehidratirane grupe eksperimentalnih životinja. Gen za acil-CoA desaturazu bio je statistički značajno povećan u M2 i M7, a gen za sfingolipid delta 4 desaturazu u M7 i CD grupama u poređenju sa kontrolom.
- Mikroerej analizom utvrđena je povećana ekspresija tri različita mala proteina toplotnog stresa u raznim dehidratiranim eksperimentalnim grupama osim u CD u poređenju sa kontrolom. U eksperimentalnoj grupi rehidratiranih kolembola H18 pokazana je ekspresija tri različita Hps70 proteina u poređenju sa kontrolom. Ovi rezultati sugerišu da su kod *O. arcticus* mali proteini toplotnog stresa uključeni u "popravku" i uklanjanje oštećenih proteina tokom procesa dehidracije, dok se tokom rehidracije aktivira familija Hsp70.
- Ova analiza pružila je osnovu i za neke dalje analize u kojima bi se utvrdilo da li su molekularni mehanizmi koji omogućuju organizmu da preživi dehidraciju isti ili različiti ukoliko je dehidracija izazvana niskom temperaturom ili kontrolisanom vlažnošću vazduha (razlika između M2 i M7 eksperimentalnih grupa sa jedne strane i PD i CD sa druge strane).

Cryptopygus antarcticus - je vrsta koja ne toleriše zamrzavanje i koju karakterišu nedovoljno razjašnjena bimodalna distribucija tačke superhlađenja kao i brze promene tačke superhlađenja u odgovoru na spoljašnje stimulse.

- Utvrđena je povećana ekspresija većeg broja gena u analiziranim H i L eksperimentalnim grupama (kolembole čija je tačka superhlađenja iznad odnosno

ispod -15°C) u poređenju sa kontrolom, što ukazuje da su obe grupe metabolički aktivne, međutim razlike u genskoj ekspresiji ukazuju na različitosti ove dve grupe eksperimentalnih životinja.

- U H grupi, analiza gena čija je ekspresija statistički značajno povećana i analiza prisutnosti GO anotacija ukazuju na visok nivo metaboličke aktivnosti. To je u saglasnosti sa dosadašnjim znanjem i razumevanjem da se H grupa sastoji od jedinki koje aktivno rastu i reprodukuju se, u periodu koji karakteriše povećana potreba za hranom i energijom.
- U L grupi, analiza gena čija je ekspresija statistički značajno povećana i analiza prisutnosti GO anotacija ukazuje na procese produkcije i sekrecije nove kutikule. Tako se ovi fiziološki procesi dovode u direktnu vezu sa otpornošću na niske temperature i sposobnost superhlađenja ovih organizama.
- Ova analiza je pružila osnovu za dalje, detaljnije analize, kao što su produkcija obimnijih cDNK biblioteka i mikroereja velike gustine što će pružiti bolji uvid u ove procese.

8. Literatura

http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html

<http://www.ebi.ac.uk/microarray-as/ae/>

<http://www.ensembl.org/index.html>

<http://www.genomicglossaries.com/>.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/gpstat.html>

<http://www.r-project.org/>

Adams M.D. i sar. (2000): The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-2195.

Adams M.D., Soares M.B., Kerlavage A.R., Fields C., Venter J.C. (1993): Rapid cDNA sequencing (expressed sequence tags) from a directionally cloned human infant brain cDNA library. *Nat. Genet.* 4, 373-380.

Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.

Ashburner M. i sar. (2000): Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.* 25, 25-29.

Avonce N., Mendoza-Vargas A., Morett E., Iturriaga G. (2006): Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC Evol. Biol.* 6, 109.

Badaut J., Lasbennes F., Magistretti P.J., Regli L. (2002): Aquaporins in brain: distribution, physiology, and pathophysiology. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 22, 367-378.

Bale J.S. (1987): Insect cold hardiness: freezing and supercooling - and ecophysiological perspective. *J. Insect Physiol.* 33, 899-908.

Bale J.S. (1996): Insect cold hardiness: a matter of life and death. *Eur. J. Entomol.* 93, 369-382.

Bale J.S. (2002): Insects and low temperatures: from molecular biology to distributions and abundance. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences* 357, 849-862.

Bale J.S. i sar. (2002): Herbivory in global climate change research: direct effects of rising temperature on insect herbivores *Global Change Biol.* 8, 1-16.

Bale J.S., Walters K.F.A. (2001): Overwintering biology as a guide to the establishment potential of non-native arthropods in the UK. In *Environment and animal development: genes, life histories and plasticity*. (D.A. Atkinson, M. Thorndyke, eds). Oxford: Bios Scientific Publishers, pp. 343-354.

- Bartel D.P. (2004): MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.
- Baust J.G., Lee R.E. (1981): Environmental "homeothermy" in an Antarctic insect. *Antarct. J. U.S.* 15, 170-172.
- Baust J.G., Zachariassen K.E. (1983): Seasonally active cell matrix associated ice nucleators in an insect. *Cryo-Letters* 4, 65-71.
- Benaroudj N., Lee D.H., Goldberg A.L. (2001): Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *J. Biol. Chem.* 276, 24261-24267.
- Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Wheeler D.L. (2007): GenBank. *Nucleic Acids Res.* 35, D21-25.
- Blagojević D. (2007): Antioxidant systems in supporting environmental and programmed adaptations to low temperatures. *CryoLetters* 28, 137-150.
- Blaxter M. (2002): Opinion piece. Genome sequencing: time to widen our horizons. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 1, 7-9.
- Block W. (1982): Cold hardiness in invertebrate poikilotherms. *Comparative Biochemistry and Physiology A Comparative Physiology* 73A, 581-593.
- Block W. (1984): A comparative study of invertebrate supercooling at Signy island, maritime Antarctic. *British Antarctic Survey Bulletin* 64, 67-76.
- Block W. (1990): Cold tolerance of insects and other arthropods. *Phil. Trans Roy. Soc. Lond. B* 326, 613-633.
- Block W. (1996): Cold or drought - The lesser of two evils for terrestrial arthropods? . *Eur. J. Entomol.* 93, 325-339.
- Block W. (2002): Interactions of water, ice nucleators and desiccation in invertebrate cold survival. *Eur. J. Entomol.* 99, 259-266.
- Block W., Webb N.R., Coulson S., Hodkinson I.D., Worland M.R. (1994): Thermal adaptation in the Arctic collembolan *Onychiurus arcticus* (Tullberg). *J. Insect Physiol.* 40, 715-722.
- Blüthgen N., Brand K., Cajavec B., Swat M., Herzel H., Beule D. (2005): Biological profiling of gene groups utilizing Gene Ontology. *Genome Inform* 16, 106-115.
- Boardman P.E., Sanz-Ezquerro J., Overton I.M., Burt D.W., Bosch E., Fong W.T., Tickle C., Brown W.R., Wilson S.A., Hubbard S.J. (2002): A comprehensive collection of chicken cDNAs. *Curr. Biol.* 12, 1965-1969.

- Boguski M.S., Lowe T.M., Tolstoshev C.M. (1993): dbEST--database for "expressed sequence tags". *Nat. Genet.* 4, 332-333.
- Breton G., Danyluk J., Ouellet F., Sarhan F. (2000): Biotechnological applications of plant freezing associated proteins. *Biotechnol. Ann. Rev.* 6, 59-101.
- Brown D.J., Sönnichsen F.D. (2002): The structure of fish antifreeze proteins. In *Fish antifreeze proteins*. (K.V. Ewart, C.L. Hew, eds). New Jersey, London, Singapore, Hong Kong: World Scientific, pp. 109-138.
- Cannon R.J.C. (1983): Experimental studies on supercooling in two Antarctic microarthropods. *J. Insect Physiol.* 29, 617-624.
- Cannon R.J.C., Block W. (1988): Cold tolerance of microarthropods. *Biological Reviews (Cambridge)* 63, 23-77.
- Carpenter J.F., Crowe J.H. (1988): The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. *Cryobiology* 25, 244-255.
- Chown S.L., Klok C.J. (1998): Interactions between desiccation resistance, host-plant contact and the thermal biology of a leaf-dwelling sub-antarctic caterpillar, *Embryonopsis horticella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). *J. Insect Physiol.* 44, 615-628.
- Chown S.L., Storey K.B. (2006): Linking molecular physiology to ecological realities. *Physiol. Biochem. Zool.* 79, 314-323.
- Christiansen K.A. (1990): Insecta: Collembola. In *Soil Biology Guide*. (D. Dindal, ed). New York: John Wiley and Sons, pp. 965-995.
- Clark M.S., Bendell L., Power D.M., Warner S., Elgar G., Ingleton P.M. (2002): Calcitonin: characterisation and expression in a teleost fish, *Fugu rubripes*. *Journal of Molecular Endocrinology* 28, 111-123.
- Clark M.S., Edwards Y.J., Peterson D., Clifton S.W., Thompson A.J., Sasaki M., Suzuki Y., Kikuchi K., Watabe S., Kawakami K., Sugano S., Elgar G., Johnson S.L. (2003): *Fugu* ESTs: new resources for transcription analysis and genome annotation. *Genome Res.* 13, 2747-2753.
- Clegg J.S. (2001): Cryptobiosis--a peculiar state of biological organization. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 128, 613-624.
- Conesa A., Gotz S., Garcia-Gomez J.M., Terol J., Talon M., Robles M. (2005): Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21, 3674-3676.

- Convey P. (1997): How are the life history strategies of Antarctic terrestrial invertebrates influenced by extreme environmental conditions? *J. Therm. Biol.* 22, 429–440.
- Coulson S.J., Hodkinson I.D., Block W., Webb N.R., Worland M.R. (1995): Low summer temperatures: a potential mortality factor for High Arctic soil microarthropods? *J. Insect Physiol.* 41, 783-792.
- Cowan K.J., Storey K.B. (2003): Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J. Exp. Biol.* 206, 1107-1115.
- Crowe J.H., Crowe L.M., Carpenter J.F., Aurell Wistrom C. (1987): Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem. J.* 242, 1-10.
- Crowe J.H., Crowe L.M., Chapman D. (1984): Preservation of Membranes in Anhydrobiotic Organisms: The Role of Trehalose. *Science* 223, 701-703.
- Dalmay T. (2006): Short RNAs in environmental adaptation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273, 1579-1585.
- Denlinger D.L. (2002): Regulation of diapause. *Annu. Rev. Entomol.* 47, 93-122.
- Denlinger D.L., Rinehart J.P., Yocum G.D. (2001): Stress proteins: a role in insect diapause? In *Insect Timing: Circadian Rhythmicity to Seasonality*. (D.L. Denlinger, J.M. Giebultowicz, D.S. Saunders, eds). Amsterdam: Elsevier, pp. 155- 171.
- DeVries A.L. (1971): Glycoproteins as biological antifreeze agents in antarctic fishes. *Science* 172, 1152-1155.
- DeVries A.L. (1986): Antifreeze glycopeptides and peptides: interactions with ice and water. *Methods Enzymol.* 127, 293-303.
- Dresios J., Aschrafi A., Owens G.C., Vanderklish P.W., Edelman G.M., Mauro V.P. (2005): Cold stress-induced protein Rbm3 binds 60S ribosomal subunits, alters microRNA levels, and enhances global protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 102, 1865-1870.
- Duman J.G. (1977): Variations in macromolecular antifreeze levels in larvae of the darkling beetle, *Meracantha contracta*. *Journal of Experimental Zoology* 201, 85-92.
- Duman J.G. (1982): Insect antifreezes and ice-nucleating agents. *Cryobiology* 19, 613-627.
- Duman J.G. (2001): Antifreeze and ice nucleator proteins in terrestrial arthropods. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 327-357.
- Duman J.G., Bennett V., Sformo T., Hochstrasser R., Barnes B.M. (2004): Antifreeze proteins in Alaskan insects and spiders. *J. Insect Physiol.* 50, 259-266.

- Duman J.G., Neven L.G., Beals J.M., Olson K.O., Castellino F.J. (1985): Freeze tolerance adaptations, including haemolymph protein and lipoprotein ice nucleators, in larvae of the crane fly *Tipula trivittata*. *J. Insect Physiol.* 31, 1-9.
- Duman J.G., Olsen T.M., Yeung K.L., Jerva F. (1995): The roles of ice nucleators in cold tolerant invertebrates. In *Biological Ice Nucleation and its Applications*. (R.E. Lee, G.J. Warren, L.V. Gusta, eds). St. Paul, Minnesota: APS Press, pp. 201-219.
- Duman J.G., Serianni A.S. (2002): The role of endogenous antifreeze protein enhancers in the hemolymph thermal hysteresis activity of the beetle *Dendroides canadensis*. *J. Insect Physiol.* 48, 103-111.
- Duman J.G., Verleye D., Li N. (2002): Site-specific forms of antifreeze protein in the beetle *Dendroides canadensis*. *Journal of Comparative Physiology B* 172, 547-552.
- Duman J.G., Wu D.W., Wolber P.K., Mueller G.M., Neven L.G. (1991): Further characterization of the lipoprotein ice nucleator from freeze tolerant larvae of the crane fly *Tipula trivittata*. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 99, 599-608.
- Dunwell J.M., Culham A., Carter C.E., Sosa-Aguirre C.R., Goodenough P.W. (2001): Evolution of functional diversity in the cupin superfamily. *Trends Biochem. Sci.* 26, 740-746.
- Ewing H.E. (1922): Note on the occurrence and distribution of Antarctic land Arthropods (Springtails Mites: Collembola and Acarina). *Entomology News* 33, 76-79.
- Farh K.K., Grimson A., Jan C., Lewis B.P., Johnston W.K., Lim L.P., Burge C.B., Bartel D.P. (2005): The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science* 310, 1817-1821.
- Feder M.E., Hofmann G.E. (1999): Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61, 243-282.
- Fields P.G., Fleurat-Lessard F., Lucien Lavenseau L., Gérard Febvay G., Lionel Peypelut L., Bonnot G. (1998): The effect of cold acclimation and deacclimation on cold tolerance, trehalose and free amino acid levels in *Sitophilus granarius* and *Cryptolestes ferrugineus* (Coleoptera). *J. Insect Physiol.* 44, 955-965.
- Fjellberg A. (1980): Identification keys to Norwegian Collembola. *Norsk Entomologisk Forening* 152.
- Fjellberg A. (1984): Collembola from Jan Mayen, Bjørnøya and Hopen Norway with additions to the species list from Spitsbergen. *Fauna Norvegica Series B* 31, 69-76.
- Fletcher G.L., Hew C.L., Davies P.L. (2001): Antifreeze proteins of teleost fishes. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 359-390.

- Gilbert J.A., Hill P.J., Dodd C.E., Laybourn-Parry J. (2004): Demonstration of antifreeze protein activity in Antarctic lake bacteria. *Microbiology* 150, 171-180.
- Goldberg A.L. (2003): Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 426, 895-899.
- Goto S.G., Kimura M.T. (1998): Heat- and cold-shock responses and temperature adaptations in subtropical and temperate species of *Drosophila*. *J. Insect Physiol.* 44, 1233-1239.
- Goyal K., Walton L.J., Tunnacliffe A. (2005): LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochem. J.* 388, 151-157.
- Graether S.P., Kuiper M.J., Gagne S.M., Walker V.K., Jia Z., Sykes B.D., Davies P.L. (2000): Beta-helix structure and ice-binding properties of a hyperactive antifreeze protein from an insect. *Nature* 406, 325-328.
- Graether S.P., Sykes B.D. (2004): Cold survival in freeze-intolerant insects: the structure and function of beta-helical antifreeze proteins. *Eur. J. Biochem.* 271, 3285-3296.
- Graham L.A., Davies P.L. (2005): Glycine-rich antifreeze proteins from snow fleas. *Science* 310, 461.
- Gressitt J.L. (1967): Introduction. Entomology of Antarctica. In *Antarctic Research Series*. (J.L. Gressitt, ed). Washington, D.C. : American Geophysical Union, pp. 1-33.
- Grubor-Lajšić G., Block W., Worland R. (1992): Comparison of the cold hardiness of two larval lepidoptera (Noctuidae). *Physiol. Entomol.* 17, 148-152.
- Grubor-Lajšić G., Block W., Telesmanić M., Jovanović A., Stevanović D., Bača F. (1997): Effect of cold acclimation on the antioxidant defense system of two larval Lepidoptera (Noctuidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 36, 1-10.
- Hall D.G., Lips A. (1999): Phenomenology and mechanism of antifreeze peptide activity. *Langmuir* 15, 1905-1912.
- Hassan Y.I., Zempleni J. (2006): Epigenetic regulation of chromatin structure and gene function by biotin. *J. Nutr.* 136, 1763-1765.
- Hayward S.A., Pavlides S.C., Tammariello S.P., Rinehart J.P., Denlinger D.L. (2005): Temporal expression patterns of diapause-associated genes in flesh fly pupae from the onset of diapause through post-diapause quiescence. *J. Insect Physiol.* 51, 631-640.
- Hayward S.A., Rinehart J.P., Denlinger D.L. (2004): Desiccation and rehydration elicit distinct heat shock protein transcript responses in flesh fly pupae. *J. Exp. Biol.* 207, 963-971.
- Hendrick J.P., Hartl F.U. (1993): Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 349-384.

- Hermes-Lima M., Storey J.M., Storey K.B. (2001): Antioxidant defenses and animal adaptation to oxygen availability during environmental stress. In *Cell and Molecular Responses to Stress*. (K.B. Storey, J.M. Storey, eds). Amsterdam: Elsevier Press, pp. 263-287.
- Hermes-Lima M., Zenteno-Savin T. (2002): Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology and Pharmacology* 133, 537-556.
- Hochachka P.W., Somero G.N. (2002): *Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution*. Oxford, New York: Oxford University Press.
- Hoffmann A.A., Sorensen J.G., Loeschke V. (2003): Adaptation of *Drosophila* to temperature extremes: bringing together quantitative and molecular approaches. *J. Therm. Biol.* 28, 175- 216.
- Holbert M.A., Marmorstein R. (2005): Structure and activity of enzymes that remove histone modifications. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, 673-680.
- Holmstrup M. (1992): Cold hardiness strategy in cocoons of the lumbricid earthworm *Dendrobaena octaedra* (Savigny). *Comparative Biochemistry and Physiology* 102A, 49-54.
- Holmstrup M., Bayley M., Ramlov H. (2002): Supercool or dehydrate? An experimental analysis of overwintering strategies in small permeable arctic invertebrates. *Proceedings of the National Academe of Science USA* 99, 5716-5720.
- Holmstrup M., Sømme L. (1998): Dehydration and cold hardiness in the Arctic Collembolon *Onychiurus arcticus* (Tullberg, 1876). *Journal of Comparative Physiology B* 168, 197-203.
- Holmstrup M., Westh P. (1994): Dehydration of earthworm cocoons exposed to cold: a novel cold hardiness mechanism. *Journal of Comparative Physiology B* 164, 312-315.
- Holmstrup M., Zachariassen K.E. (1996): Physiology of cold hardiness in earthworms: a review. *Comparative Biochemistry and Physiology* 115A, 91-101.
- Hong-Bo S., Zong-Suo L., Ming-An S. (2005): LEA proteins in higher plants: structure, function, gene expression and regulation. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 45, 131-135.
- Horman S., Hussein N., Brichard S., Dilworth S.M., Storey K.B., Rider M.H. (2005): Evaluation of the role of AMP-activated protein kinase and its downstream targets in mammalian hibernation. *Comparative Biochemistry and Physiology* 142B, 374 -382.
- Hoshino T., Kiriaki M., Nakajima T. (2003): Novel thermal hysteresis proteins from low temperature basidiomycete, *Coprinus psychromorbidus*. *Cryo-Letters* 24, 135-142.

- Hulbert A.J. (2003): Life, death and membrane bilayers. *J. Exp. Biol.* 206, 2303-2311.
- Humbert W. (1979): The midgut of *Tomocerus minor* Lubbock (Insecta, Collembola): ultrastructure, cytochemistry, ageing and renewal during a moulting cycle. *Cell Tissue Res.* 196, 39-57.
- Itoh T., Rai T., Kuwahara M., Ko S.B., Uchida S., Sasaki S., Ishibashi K. (2005): Identification of a novel aquaporin, AQP12, expressed in pancreatic acinar cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330, 832-838.
- Janetschek H. (1967): Arthropod ecology of South Victoria Land. In *Antarctic Research Series*. (J.L. Gressitt, ed). Washington, D.C. : American Geophysical Union, pp. 205–293.
- Jia Z., Davies P.L. (2002): Antifreeze proteins: an unusual receptor-ligand interaction. *Trends Biochem. Sci.* 27, 101-106.
- Joanisse D.R., Storey K.B. (1998): Oxidative stress and antioxidants in stress and recovery of cold-hardy insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28, 23–30.
- Job D., Rauch C.T., Fischer E.H., Margolis R.L. (1982): Recycling of cold-stable microtubules: evidence that cold stability is due to substoichiometric polymer blocks. *Biochemistry* 21, 509-515.
- Johnston S.L., Lee R.E. (1990): Regulation of supercooling and nucleation in a freeze intolerant beetle (*Tenebrio molitor*). *Cryobiology* 27, 562-568.
- Joplin K.H., Yocum G.D., Denlinger D.L. (1990): Cold shock elicits expression of the heat shock proteins in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*. *J. Insect Physiol.* 36, 825-834.
- Jovanović-Galović A., Blagojević D., Grubor-Lajšić G., Worland R., Spasić, M.B. (2004): Role of antioxidant defense during different stages of preadult life cycle in European corn borer (*Ostrinia nubilalis*, Hubn.): diapause and metamorphosis. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 55, 79–89.
- Jovanović-Galović A., Blagojević D.P., Grubor-Lajšić G., Worland M.R., Spasić M.B. (2007): Antioxidant Defense in Mitochondria During Diapause and Postdiapause Development of European Corn Borer (*Ostrinia nubilalis*, Hubn.). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 64, 111-119.
- Ju Z., Dunham R.A., Liu Z. (2002): Differential gene expression in the brain of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in response to cold acclimation. *Mol. Genet. Genomics* 268, 87-95.

- Kageyama T. (1976): Pathways of carbohydrate metabolism in the eggs of the silkworm moth, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 6, 507–511.
- Karow A.M. (1991): Chemical cryoprotection of metazoan cells. *Bioscience* 41, 155- 160.
- Keilin D. (1959): The problem of anabiosis or latent life: history and current concept. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences* 150, 149-191.
- Kikawada T., Nakahara Y., Kanamori Y., Iwata K., Watanabe M., McGee B., Tunnacliffe A., Okuda T. (2006): Dehydration-induced expression of LEA proteins in an anhydrobiotic chironomid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348, 56-61.
- Knight C.A., DeVries A.L., Oolman L.D. (1984): Fish antifreeze protein and the freezing and recrystallization of ice. *Nature* 308, 295-296.
- Knight C.A., Duman J.G. (1986): Inhibition of recrystallization of ice by insect thermal hysteresis proteins: a possible cryoprotective role. *Cryobiology* 23, 256–262.
- Kondrashov F.A., Koonin E.V., Morgunov I.G., Finogenova T.V., Kondrashova M.N. (2006): Evolution of glyoxylate cycle enzymes in Metazoa: evidence of multiple horizontal transfer events and pseudogene formation. *Biology Direct* 1, 31.
- Kristiansen E., Zachariassen K.E. (2005): The mechanism by which fish antifreeze proteins cause thermal hysteresis. *Cryobiology* 51, 262-280.
- Kruse E., Uehlein N., Kaldenhoff R. (2006): The aquaporins. *Genome Biology* 7, 206.
- Lamitina S.T., Strange K. (2005): Transcriptional targets of DAF-16 insulin signaling pathway protect *C. elegans* from extreme hypertonic stress. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288, C467-474.
- Larade K., Storey K.B. (2002): Reversible suppression of protein synthesis in concert with polysome disaggregation during anoxia exposure in *Littorina littorea*. *Mol. Cell. Biochem.* 232, 121-127.
- Leather S.R., Walters K.F.A., Bale J.S. (1993): *The Ecology of Insect Overwintering*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Lee R.E., Costanzo J.P., Lee M.R. (1998): Reducing the cold-hardiness of insect pests using ice nucleating active microbes. In *Temperature sensitivity in insects and application in integrated pest management* (G.J. Hallman, D.L. Denlinger, eds). Boulder, Colorado: Westview Press, pp. 97-124.
- Lee R.E., Lee M.R., Strong-Gunderson J.M. (1993): Insect cold-hardiness and ice nucleating active microorganisms including their potential use for biological control. *J. Insect Physiol.* 39, 1-12.

- Leinaas H.P. (1983): Synchronized moulting controlled by communication in group-living Collembola. *Science* 219, 193–195.
- Li Q., Luo L. (1993): The kinetic theory of thermal hysteresis of a macromolecule solution. *Chemical Physics Letters* 216, 453-457.
- Li Q., Luo L. (1994): Further Discussion on the thermal Hysteresis of the ice growth inhibitor. *Chemical Physics Letters* 223, 181-184.
- Lindon J.C., Holmes E., Bollard M.E., Stanley E.G., Nicholson J.K. (2004): Metabonomics technologies and their applications in physiological monitoring, drug safety assessment and disease diagnosis. *Biomarkers* 9, 1-31.
- Lindquist S. (1986): The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 1151-1191.
- Logue J.A., de Vries A.L., Fodor E., Cossins A.R. (2000): Lipid compositional correlates of temperature-adaptive interspecific differences in membrane physical structure. *J. Exp. Biol.* 203, 2105-2115.
- Lundheim R. (1997): Adaptive and Incidental Biological Ice Nucleators. *The Norwegian University of Science and Technology, Trondheim*, Dr. Scient. Thesis.
- MacDonald J.A. (2004): Signal transduction pathways and the control of cellular responses to external stimuli. In *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation* (K.B. Storey, ed). Hoboken, NJ: Wiley-Liss, pp. 87-123.
- MacRae T.H. (2003): Molecular chaperones, stress resistance and development in *Artemia franciscana*. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 14, 251-258.
- Mans B.J., Andersen J.F., Francischetti I.M., Valenzuela J.G., Schwan T.G., Pham V.M., Garfield M.K., Hammer C.H., Ribeiro J.M. (2008): Comparative sialomics between hard and soft ticks: implications for the evolution of blood-feeding behavior. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 42-58.
- Marra M. i sar. (1999): An encyclopedia of mouse genes. *Nat. Genet.* 21, 191-194.
- Marshall C.B., Daley M.E., Graham L.A., Sykes B.D., Davies P.L. (2002): Identification of the ice-binding face of antifreeze protein from *Tenebrio molitor*. *FEBS Lett.* 529, 261-267.
- McKusick V.A., Ruddle F.H. (1987): Toward a complete map of the human genome. *Genomics* 1, 103-106.
- Michaud M.R., Denlinger D.L. (2004): Molecular modalities of insect cold survival: current understanding and future trends. *International Congress Series* 1275, 32-46.
- Neven L.G., Duman J.G., Low M.G., Sehl L.C., Castellino F.J. (1989): Purification and characterization of an insect hemolymph lipoprotein ice nucleator: Evidence for the

- importance of phosphatidylinositol and apolipoprotein in the ice nucleator activity. *Journal of Comparative Physiology B* 159, 71-82.
- Odani M., Komatsu Y., Oka S., Iwahashi H. (2003): Screening of genes that respond to cryopreservation stress using yeast DNA microarray. *Cryobiology* 47, 155-164.
- Oku K., Watanabe H., Kubota M., Fukuda S., Kurimoto M., Tsujisaka Y., Komori M., Inoue Y., Sakurai M. (2003): NMR and quantum chemical study on the OH...pi and CH...O interactions between trehalose and unsaturated fatty acids: implication for the mechanism of antioxidant function of trehalose. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 12739-12748.
- Oleksiak M.F., Kolell K.J., Crawford D.L. (2001): The utility of natural populations for microarray analyses: isolation of genes necessary for functional genomic studies. *Mar. Biotechnol.* 3, S203-S211.
- Olsen T., Sass S., Li N., Duman J. (1998): Factors contributing to seasonal increases in inoculative freezing resistance in overwintering fire-colored beetle larvae *Dendroides canadensis*. *J. Exp. Biol.* 201 (Pt 10), 1585-1594.
- Olsen T.M., Duman J.G. (1997): Maintenance of the supercooled state in overwintering Pyrochroid beetle larvae *Dendroides canadensis*: role of hemolymph ice nucleators and antifreeze proteins. *Journal of Comparative Physiology B* 167, 105-113.
- Overgaard J., Sorensen J.G., Petersen S.O., Loeschcke V., Holmstrup M. (2005): Changes in membrane lipid composition following rapid cold hardening in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 51, 1173-1182.
- Parkinson J., Anthony A., Wasmuth J., Schmid R., Hedley A., Blaxter M. (2004): PartiGene--constructing partial genomes. *Bioinformatics* 20, 1398-1404.
- Perteau G., Huang X., Liang F., Antonescu V., Sultana R., Karamycheva S., Lee Y., White J., Cheung F., Parvizi B., Tsai J., Quackenbush J. (2003): TIGR Gene Indices clustering tools (TGICL): a software system for fast clustering of large EST datasets. *Bioinformatics* 19, 651-652.
- Rabbani M.A., Maruyama K., Abe H., Khan M.A., Katsura K., Ito Y., Yoshiwara K., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2003): Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant Physiol.* 133, 1755-1767.
- Ramnanan C.J., Storey K.B. (2006): Glucose-6-phosphate dehydrogenase regulation during hypometabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339, 7-16.

- Ramos-Vasconcelos G.R., Hermes-Lima M. (2003): Hypometabolism, antioxidant defenses and free radical metabolism in the pulmonate land snail *Helix aspersa*. *J. Exp. Biol.* 206, 675-685.
- Raymond J.A., DeVries A.L. (1972): Freezing behavior of fish blood glycoproteins with antifreeze properties. *Cryobiology* 9, 541-547.
- Raymond J.A., DeVries A.L. (1977): Adsorption inhibition as a mechanism of freezing resistance in polar fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74, 2589-2593.
- Raymond J.A., Wilson P., DeVries A.L. (1989): Inhibition of growth of nonbasal planes in ice by fish antifreezes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86, 881-885.
- Regier J.C., Shultz J.W., Kambic R.E. (2005): Pancrustacean phylogeny: hexapods are terrestrial crustaceans and maxillopods are not monophyletic. *Proceedings of the Royal Society B* 272, 395-401.
- Renn S.C., Aubin-Horth N., Hofmann H.A. (2004): Biologically meaningful expression profiling across species using heterologous hybridization to a cDNA microarray. *BMC Genomics* 5, 1-13.
- Rice P., Longden I., Bleasby A. (2000): EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet.* 16, 276-277.
- Rinehart J.P., Denlinger D.L. (2000): Heat-shock protein 90 is down-regulated during pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, but remains responsive to thermal stress. *Insect Mol. Biol.* 9, 641-645.
- Rinehart J.P., Yocum G.D., Denlinger D.L. (2000): Developmental upregulation of inducible hsp70 transcripts, but not the cognate form, during pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 515-521.
- Ring R.A. (1982): Freezing-tolerant insects with low supercooling points. *Comparative Biochemistry and Physiology* 73A, 605-612.
- Ring R.A., Danks H.V. (1994): Desiccation and cryoprotection: overlapping adaptations. *Cryo-Letters* 15, 181-190.
- Ritchie M.E., Silver J., Oshlack A., Holmes M., Diyagama D., Holloway A., Smyth G.K. (2007): A comparison of background correction methods for two-colour microarrays. *Bioinformatics* 23, 2700-2707.

- Roberts J.K., DeSimone N.A., Lingle W.L., Dure L., 3rd (1993): Cellular Concentrations and Uniformity of Cell-Type Accumulation of Two Lea Proteins in Cotton Embryos. *Plant Cell* 5, 769-780.
- Rojas R.R., Leopold R.A. (1996): Chilling injury in the housefly: Evidence for the role of oxidative stress between pupariation and emergence. *Cryobiology* 33, 447-458.
- Rothery P., Block W. (1992): Characterizing supercooling point distributions. *Cryo-Letters* 13, 193-198.
- Rudolph A.S., Crowe J.H. (1985): Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology* 22, 367-377.
- Russotti G., Campbell J., Toner M., Yarmush M.L. (1997): Studies of heat and PGA1-induced cold tolerance show that HSP27 may help preserve actin morphology during hypothermia. *Tissue Eng.* 3, 135- 147.
- Salt R.W. (1961a): Principles of insect cold hardiness. *Annu. Rev. Entomol.* 6, 58-74.
- Salt R.W. (1961b): Resistance of poikilothermic animals to cold. *Br. Med. Bull.* 17, 5-8.
- Salt R.W. (1969): The survival of insects at low temperatures. *Symposia of the Society for Experimental Biology* 23, 331-350.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989): *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schenker R. (1984): Effects of temperature acclimation on cold hardiness of Antarctic microarthropods. *Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol* 21, 205-220.
- Seki M. i sar. (2002): Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J.* 31, 279-292.
- Simek P., Sula J., Kostal V. (1998): Physiology of drought tolerance and cold hardiness of the Mediterranean tiger moth *Cymbalophora pudica* during summer diapause. *J. Insect Physiol.* 44, 165-173.
- Sinclair B.J. (1999): Insect cold tolerance: How many kinds of frozen? *Eur. J. Entomol.* 96, 157-164.
- Sinclair B.J., Jaco Klok C., Scott M.B., Terblanche J.S., Chown S.L. (2003a): Diurnal variation in supercooling points of three species of Collembola from Cape Hallett, Antarctica. *J. Insect Physiol.* 49, 1049-1061.
- Sinclair B.J., Sjørnsen H. (2001): Terrestrial invertebrate abundance across a habitat transect in Keble Valley, Ross Island, Antarctica. *Pedobiologia* 45, 134-145.

- Sinclair B.J., Vernon P., Jaco Klok C., Chown S.L. (2003b): Insects at low temperatures: an ecological perspective. *Trends in Ecology and Evolution* 18, 257-262.
- Smyth G.K. (2004): Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* 3, Article3.
- Smyth G.K. (2005): Limma: linear models for microarray data. In *In Bioinformatics and computational biology solutions using R and Bioconductor*. (R. Gentleman, V. Carey, S. Dudoit, R. Irizarry, W. Huber, eds). New York: Springer, pp. 397-420.
- Smyth G.K., Michaud J., Scott H.S. (2005): Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* 21, 2067-2075.
- Smyth G.K., Speed T. (2003): Normalization of cDNA microarray data. *Methods* 31, 265-273.
- Sømme L. (1981): Cold tolerance of alpine, Arctic, and Antarctic Collembola and mites. *Cryobiology* 18, 212-220.
- Sømme L. (1982): Supercooling and winter survival in terrestrial arthropods. *Comparative Biochemistry and Physiology* 73A, 519-543.
- Sømme L. (1995): *Invertebrates in Hot and Cold Arid Environments*. Berlin: Springer-Verlag.
- Sømme L., Birkemoe T. (1997): Cold tolerance and dehydration in Enchytraeidae from Svalbard. *Journal of Comparative Physiology B* 167, 264-269.
- Sømme L., Block W. (1982): Cold hardiness of Collembola at Signy Island, maritime Antarctic. *Oikos* 38, 168-176.
- Sømme L., Conradi-Larsen E.M. (1977): Cold-hardiness of collembolans and oribatid mites from windswept mountain ridges. *Oikos* 29, 118-126.
- Stach J. (1962): On the fauna of Collembola from Spitsbergen. *Acta Zool. Cracov.* 7, 1-20.
- Stanić B, Jovanović-Galović A., Blagojević D.P., Grubor-Lajšić G., Worland R., Spasić M.B. (2004): Cold hardiness in *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera:Pyralidae): Glycerol content, haxose monophosphate shunt activity, and antioxidative defense system. *Eur. J. Entomol.* 101, 459-466.
- Steele J.E. (1961): Occurrence of a hyperglycaemic factor in the corpus cardiacum of an insect. *Nature* 192, 680-681.
- Storey K.B. (1997): Organic solutes in freezing tolerance. *Comparative Biochemistry and Physiology A Comparative Physiology* 117, 319-326.
- Storey K.B. (2003): Mammalian hibernation. Transcriptional and translational controls. *Adv. Exp. Med. Biol.* 543, 21-38.

- Storey K.B. (2004): Adventures in oxygen metabolism. *Comparative biochemistry and physiology. Part B. Biochemistry and molecular biology* 139, 359-369.
- Storey K.B. (2006a): Reptile freeze tolerance: metabolism and gene expression. *Cryobiology* 52, 1-16.
- Storey K.B. (2006b): Gene hunting in hypoxia and exercise. *Adv. Exp. Med. Biol.* 588, 293-309.
- Storey K.B. (2007): Anoxia tolerance in turtles: metabolic regulation and gene expression. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology* 147, 263-276.
- Storey K.B., Storey J.M. (1988): Freeze tolerance in animals. *Physiol. Rev.* 68, 27-84.
- Storey K.B., Storey J.M. (2004): Metabolic rate depression in animals: transcriptional and translational controls. *Biological Review and Biological Proceedings of the Cambridge Philosophical Society* 79, 207-233.
- Storey K.B., Storey J.M. (2007): Tribute to P. L. Lutz: putting life on 'pause'--molecular regulation of hypometabolism. *J. Exp. Biol.* 210, 1700-1714.
- Strong-Gunderson J.M., Lee R.E., Lee M.R. (1989): Ice-nucleating bacteria promote transcuticular nucleation in insects. *Cryobiology* 26, 551.
- Strong-Gunderson J.M., Lee R.E., Lee M.R., Riga T.J. (1990): Ingestion of ice-nucleating active bacteria increases the supercooling point of the lady beetle *Hippodamia convergens*. *J. Insect Physiol.* 36, 153-157.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007): MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596-1599.
- Terlecky S.R., Chiang H.L., Olson T.S., Dice J.F. (1992): Protein and peptide binding and stimulation of in vitro lysosomal proteolysis by the 73-kDa heat shock cognate protein. *J. Biol. Chem.* 267, 9202-9209.
- Thibaud J.M. (1968): Cycle de tube digestif lors de l'intermue chez les Hypogastruridae (Collemboles) épigés et cavernicoles. *Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol* 4, 647-655.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
- Tian W.N., Braunstein L.D., Apse K., Pang J., Rose M., Tian X., Stanton R.C. (1999): Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cell death. *American Journal of Physiology* 276, C1121-1131.

- Tilbrook P.J. (1970): The biology of *Cryptopygus antarcticus*. In *Antarctic Ecology*. (M.W. Holdgate, ed). London: Academic Press, pp. 908-918.
- Tilbrook P.J. (1977): Energy flow through a population of the col- lembolan *Cryptopygus antarcticus*. In *Adaptations within Antarctic ecosystems*. (G. Llano, ed). Washington DC.: Smithsonian Institution, pp. 935-946.
- Timmermans M.J., de Boer M.E., Nota B., de Boer T.E., Marien J., Klein-Lankhorst R.M., van Straalen N.M., Roelofs D. (2007): Collembase: a repository for springtail genomics and soil quality assessment. *BMC Genomics* 8, 341.
- Tsumuki H., Rojas R.R., Storey K.B., Baust J.G. (1987): The fate of [14C] glucose during cold-hardening in *Eurosta solidaginis* (Fitch). *Insect Biochem.* 17, 347–352.
- Tsvetkova N.M., Horvath I., Torok Z., Wolkers W.F., Balogi Z., Shigapova N., Crowe L.M., Tablin F., Vierling E., Crowe J.H., Vigh L. (2002): Small heat-shock proteins regulate membrane lipid polymorphism. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 99, 13504-13509.
- Tursman D., Duman J.G. (1995): Cryoprotective effects of thermal hysteresis protein on survivorship of frozen gut cells from the freeze tolerant centipede *Lithobius forficatus*. *Journal of Experimental Zoology* 272, 249-257.
- Tyson T., Reardon W., Browne J.A., Burnell A.M. (2007): Gene induction by desiccation stress in the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* reveals parallels with drought tolerance mechanisms in plants. *Int. J. Parasitol.* 37, 763-776.
- UniProt-Consortium (2007): The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res.* 35, D193-197.
- Ursini M.V., Parrella A., Rosa G., Salzano S., Martini G. (1997): Enhanced expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human cells sustaining oxidative stress. *Biochem. J.* 323 (Pt 3), 801-806.
- Valpas A. (1967): Notes on the arthropod fauna of Spitsbergen. I: 4. Collemboles of Spitsbergen. *Ann. Entomol. Fenn.* 33, 28-40.
- van Breukelen F., Sonenberg N., Martin S.L. (2004): Seasonal and state-dependent changes of eIF4E and 4E-BP1 during mammalian hibernation: implications for the control of translation during torpor. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287, R349-353.
- Waldby C. (2001): Code unknown: histories of the gene. [Reviews of: Keller, EF. The century of the gene. Harvard University Press, 2000 and Kay, LE. Who wrote the

- book of life? A history of the genetic code. Stanford University Press, 2000]. *Social Studies of Science* 31, 779-791.
- Wasylyk J.M., Tice A.R., Baust J.G. (1988): Partial glass formation: A novel mechanism of insect cryoprotection. *Cryobiology* 25, 451-458.
- Werker A.R., Dewar A.M., Harrington R. (1998): Modelling the incidence of virus yellows in sugar beet in the UK in relation to numbers of migrating *Myzus persicae*. *J. Appl. Ecol.* 35, 811-818.
- Wharton D.A., Ferns D.J. (1995): Survival of intracellular freezing by the Antarctic nematode *Panagrolaimus davidi*. *J. Exp. Biol.* 198, 1381-1387.
- Williams J.B., Shorthouse J.D., Lee R.E., Jr. (2002): Extreme resistance to desiccation and microclimate-related differences in cold-hardiness of gall wasps (Hymenoptera: Cynipidae) overwintering on roses in southern Canada. *J. Exp. Biol.* 205, 2115-2124.
- Willsie J.K., Clegg J.S. (2001): Nuclear p26, a small heat shock/alpha-crystallin protein, and its relationship to stress resistance in *Artemia franciscana* embryos. *J. Exp. Biol.* 204, 2339-2350.
- Wise M.J., Tunnacliffe A. (2004): POPP the question: what do LEA proteins do? *Trends Plant Sci.* 9, 13-17.
- Wishart D.S., Arndt D., Berjanskii M., Guo A.C., Shi Y., Shrivastava S., Zhou J., Zhou Y., Lin G. (2008): PPT-DB: the protein property prediction and testing database. *Nucleic Acids Res.* 36, D222-229.
- Wood F.E., Nordin J.H. (1980): Activation of the hexose monophosphate shunt during cold-induced glycerol accumulation by *Protophormia terranova*. *Insect Biochem.* 10, 87-93.
- Worland M.R. (1996): The relationship between water content and cold tolerance in the Arctic collembolan *Onychiurus arcticus* (Collembola: Onychiuridae). *Eur. J. Entomol.* 93, 341-348.
- Worland M.R. (2005): Factors that influence freezing in the sub-Antarctic springtail *Tullbergia antarctica*. *J. Insect Physiol.* 51, 881-894.
- Worland M.R., Convey P. (2001): Rapid cold hardening in Antarctic microarthropods. *Funct. Ecol.* 15, 515-524.
- Worland M.R., Grubor-Lajšić G., Montie P.O. (1998): Partial desiccation induced by sub-zero temperatures as a component of the survival strategy of the Arctic collembolan *Onychiurus arcticus* (Tullberg). *J. Insect Physiol.* 44, 211-219.

- Worland R., Block W., Grubor-Lajšić G. (2000): Survival of *Heleomyza borealis* (Diptera, Heleomyzidae) larvae down to -60 degrees C. *Physiol. Entomol.* 25, 1-5.
- Worland M.R., Leinaas H.P., Chown S.L. (2006): Supercooling point frequency distributions in Collembola are affected by moulting. *Funct. Ecol.* 20, 323-329.
- Yang B., Ma T., Xu Z., Verkman A.S. (1999): cDNA and genomic cloning of mouse aquaporin-2: functional analysis of an orthologous mutant causing nephrogenic diabetes insipidus. *Genomics* 57, 79-83.
- Yocum G.D. (2001): Differential expression of two HSP70 transcripts in response to cold shock, thermoperiod, and adult diapause in the Colorado potato beetle. *J. Insect Physiol.* 47, 1139-1145.
- Yocum G.D., Joplin K.H., Denlinger D.L. (1998): Upregulation of a 23 kDa small heat shock protein transcript during pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28, 677-682.
- Young J.C., Moarefi I., Hartl F.U. (2001): Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J. Cell Biol.* 154, 267-273.
- Young S.R., Block W. (1980): Experimental studies on the cold tolerance of *Alaskozetes antarcticus*. *J. Insect Physiol.* 26, 189-200.
- Zachariassen K.E. (1985): Physiology of cold tolerance in insects. *Physiol. Rev.* 65, 799-832.
- Zachariassen K.E. (1991): Hypothermia and cellular physiology. *Arctic Medical Research* 50 Suppl 6, 13-17.
- Zachariassen K.E. (1992): Ice nucleating agents in cold-hardy insects. In *Water and Life*. (G.N. Somero, C.B. Osmond, C.L. Bolis, eds). Berlin: Springer-Verlag, pp. 261-281.
- Zachariassen K.E., Baust J.G., Lee R.E. (1982): A method for quantitative determination of ice nucleating agents in insect hemolymph. *Cryobiology* 19, 180-184.

BIOGRAFIJA



Mr Jelena Purać je rođena 1978. godine u Novom Sadu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Osnovne studije je upisala 1997. godine na Biološkom fakultetu u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija, a diplomirala je u oktobru 2002. godine sa prosečnom ocenom 9,34. Eksperimentalni deo diplomskog rada je uradila u laboratoriji dr Selme Kanazir na odeljenju za Molekularnu neurobiologiju, na Institutu za Biološka istraživanja «Siniša Stanković». Diplomski rad na temu «Ekspresija α -sinukleina u adultnim i fetalnim humanim tkivima» odbranila je sa ocenom 10. Poslediplomske studije upisala je 2002. godine na Biološkom fakultetu u Beogradu, smer Genetika. Položila je sve predviđene ispite sa prosečnom ocenom 10. Eksperimentalni deo magistarske teze je uradila pod rukovodstvom dr Borislava Kobiljskog u Zavodu za strna žita, Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu. Magistarsku tezu pod naslovom «Detekcija alelnih varijabilnosti u lokusu Rht8 gena pšenice primenom molekularnih markera – mikrosatelita» odbranila je 25.04.2005. godine.

Od oktobra 2004. do marta 2005. godine je kao stipendista Ministarstva bila angažovana na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu, na Katedri za genetiku i oplemenjivanje biljaka. Od marta 2005. drži vežbi iz predmeta «Osnovi molekularne biologije» na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, na kom je u julu 2005. godine izabrana u zvanje i na radno mesto asistenta za užu naučnu oblast Molekularna biologija.

Od septembra 2005. do septembra 2008. godine je pod mentorstvom dr Gordane Grubor-Lajšić bila je angažovana je na FP6 projektu «Dormancy of cells and organisms-strategies for survival and preservation», br. FP6-2003-NEST-B-1, 2005 – 2008, kao doktorant (PhD student). U okviru ovog projekta provela je dve godine u Institutu «British Antarctic Survey», u laboratoriji za molekularnu biologiju, Kembridž, Engleska. Trenutno je angažovana na projektu republičkog programa iz osnovnih istraživanja «Uloga redoks aktivnih supstanci u održavanju homeostaze živih sistema», br. projekta: 143034, 2005 - 2010.

Do sada je kao autor ili koautor objavila 2 naučna rada u vrhunskim međunarodnim časopisima, 1 rad u vodećem časopisu nacionalnog značaja i učestvovala je na više naučnih skupova u zemlji i inostranstvu. Posедуje aktivno znanje engleskog jezika.

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA BIOLOGIJU I EKOLOGIJU
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj:
RBR

Identifikacioni broj:
IBR

Tip dokumentacije: Monografska publikacija
TD

Tip zapisa: Tekstualni štampani materijal
TZ

Vrsta rada: Doktorska disertacija
VR

Autor: Jelena Purać
AU

Mentor: dr Gordana Grubor-Lajšić, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet,
Univerzitet u Novom Sadu
MN

Naslov rada: Molekularne osnove otpornosti polarnih insekata na niske temperature
NR

Jezik publikacije: srpski (latinica)
JP

Jezik izvoda: srpski/engleski
JI

Zemlja publikovanja: Republika Srbija
ZP

Uže geografsko područje: Vojvodina
UGP

Godina: 2009.
GO

Izdavač: Autorski reprint
IZ

Mesto i adresa: Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za biologiju i ekologiju, Trg Dositeja Obradovića 2

MA

Fizički opis rada: poglavlja (7), strana (117), tabela (20), slika (5), šema (4) literaturnih navoda (244)

FO

Naučna oblast: Biologija

NO

Naučna disciplina: Molekularna biologija

ND

Ključne reči: insekti, kolebole, niske temperature, molekularni mehanizmi

KR

Univerzalna decimalna klasifikacija:

UDK

Čuva se: U biblioteci Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Trg Dositeja Obradovića 2, 21000 Novi Sad, Srbija

ČU

Važna napomena: nema

VN

Izvod:

Sposobnost insekata da se prilagode različitim ekološkim uslovima je veoma dobro dokumentovana; oni predstavljaju najrasprostranjeniju grupu životinja na planeti, sa vrstama koje naseljavaju različita kopnena i vodena staništa, od tropskih predela do polova. Razumevanje mehanizama koji omogućavaju insektima da prežive ekstremne temperature i zadrže vitalne funkcije tokom dugog perioda dormancije je kao model sistem od interesa za mnoge naučne oblasti. Na osnovu načina na koji preživljavaju temperature ispod 0°C insekte možemo podeliti u tri grupe: *i*) insekti koji tolerišu formiranje leda u ekstraćelijskom prostoru, *ii*) insekti koji ne tolerišu zamrzavanje i moraju da ga izbegnu, a to čine superhlađenjem svojih telesnih tečnosti i *iii*) insekti koji preživljavaju zahvaljujući gubitku vode kroz permeabilnu kutikulu, što je nazvano krioprotektivna dehidratacija. Zajednička odlika organizama sa različitim mehanizmima adaptacije na niske temperature je set biohemijских jedinjenja čija se fiziološka funkcija razlikuje u zavisnosti da li organizam pripada grupi koja toleriše ili ne toleriše zamrzavanje. To su nukleatori kristalizacije leda, krio/anhidroprotektanti i antifriz proteini.

Cilj ovih istraživanja je bio ispitivanje molekularne osnove otpornosti na niske temperature dve vrste polarnih kolembola *Onychiurus arcticus* i *Cryptopygus antarcticus* kombinujući fiziološki, biohemijski i molekularno biološki pristup. Ispitivane vrste izbegavaju zamrzavanje svojih telesnih tečnosti primenjujući različite strategije preživljavanja. Za antarktičku vrstu *C. antarcticus* karakteristična je brza promena tačke superhlađenja, kao i njena bimodalna distribucija tokom leta, kada neke jedinke mrznu na višim temperaturama (manje otporne na hladnoću), a druga na nižim (otpornije na hladnoću). Ova bimodalna distribucija tačke superhlađenja je dobro dokumentovana, ali slabo razjašnjena na

molekularnom nivou. Druga, arktička vrsta *O. arcticus* koristi strategiju preživljavanja zimskih temperature koje idu i do -25°C nazvanu krioprotektivna dehidracija. Na ovaj način, količina slobodne vode u telu se značajno redukuje, a akumulira se trehaloza koja deluje kao krio/anhidroprotektant. Iako je krioprotektivna dehidracija opisana i kod drugih vrsta insekata, molekularni mehanizmi koji se nalaze u osnovi ovog fenomena su veoma slabo razjašnjeni.

Za karakterizaciju genoma generisano je 16379 EST sekvenci za *O. arcticus* i 1180 za *C. antarcticus*. To su ujedno i prvi javno dostupni podaci u bazama podataka o genomima ove dve vrste koji predstavljaju značajnu osnovu za komparativne genomske analize. Činjenica da kod obe analizirane vrste, oko 60% EST sekvenci nije pokazalo statistički značajnu sličnost sa proteinima iz baza podataka ukazuje na specifičan patern genske ekspresije kao adaptivni odgovor ispitivanih vrsta na niske temperature.

Sa ciljem da se identifikuju geni uključeni u preživljavanje niskih temperatura konstruisani su mikroereji, za *O. arcticus* štampanjem 6912 cDNK u duplikatu, a za *C. antarcticus* štampanjem 672 cDNK u duplikatu.. Analizom sekvenci identifikovanih putem homologije sa dostupnm bazama podataka kod *C. antarcticus* uočen je jasan trend povećane ekspresije gena koji kodiraju strukturne proteine u grupi koja je otporna na hladnoću. Ove strukturne proteine uglavnom čine kutikularni proteini, što je u skladu sa rezultatima nedavnih istraživanja kod kolembola, da je presvlačenje proces tokom kog se snižava tačka superhlađenja, odnosno da varijacije u tački superhlađenja mogu nastati kao posledica endogenih fizioloških procesa tokom presvlačenja. Kod *O. arcticus* analizom EST sekvenci i mikroereja identifikovani su potencijalni geni i biohemijski putevi povezani sa krioprotektivnom dehidracijom, a istakli bi gene uključene u metabolizam ugljenih hidrata, gene za akvaporine, proteine toplotnog stresa, LEA proteine i enzime antioksidativne zaštite.

IZ

Datum prihvatanja teme od strane NN veća: 13.11.2008.

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

KO

Predsednik: dr Duško Blagojević, naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Beograd

Član: dr Gordana Grubor-Lajšić, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, mentor

Član: dr Branka Vasiljević, naučni savetnik, Institut za molekularnu genetiku i genetički inženjering, Beograd

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCES
KEY WORDS DOCUMENTATION**

Accession number:
ANO

Identification number:
INO

Document type: Monograph type
DT

Type of record: Printed text
TR

Contents code: PhD Thesis
CC

Author: Jelena Purać
AU

Mentor: dr Gordana Grubor-Lajšić, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad
MN

Title: Molecular mechanisms of low temperatures survival in polar insects
TL

Language of text: Serbian
LT

Language of abstract: Serbian/English
LA

Country of publication: Republic of Serbia
CP

Locality of publication: Vojvodina
LP

Publication year: 2009.
PY

Publisher: Author's reprint
PU

Publication place: University of Novi Sad, Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, Trg Dositeja Obradovića 2, Novi Sad

PP

Physical description: chapters (7), pages (117), tables (20), figures (5), schemes (4), references (244)

PD

Scientific field: Biology

SF

Scientific discipline: Molecular Biology

SD

Key words: Insecta, Collembola, low temperatures, molecular mechanisms

KW

Holding data: The Library of Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 2, 21000 Novi Sad, Serbia

HD

Note: No

N

Abstract:

The ability of insects to adapt to diverse ecological conditions is well documented; they are the most diverse fauna on earth, with different species occupying a range of terrestrial and aquatic habitats from the tropics to the poles. Understanding the mechanisms by which insects survive such extreme temperatures and retain viability for long periods in the dormant state is of great interest to many scientific fields. Insects have evolved three main strategies to survive sub-zero temperatures: *i*) freeze tolerance, *ii*) freeze avoidance and *iii*) cryoprotective dehydration. The main biochemical compounds involved in surviving sub-zero temperatures are same for different strategies but their physiological role is different. They include: ice nucleating agents (INAs), cryo/ anhydroprotectants, and antifreeze proteins (AFPs).

The aim of this study was to determine molecular adaptations to extreme cold environments, combining physiology, biochemistry and molecular biology approaches, in the Polar Collembola: *Cryptopygus antarcticus* and *Onychiurus arcticus*. Both species are freeze avoiding but employ different strategies for surviving low temperatures. The Antarctic springtail *C. antarcticus* is capable of rapid cold hardening with a bi-modal distribution of super cooling points (SCP) with high (less cold-hardened) and low (more cold-hardened) groups of animals present even during the growing season in summer. This bimodal distribution has been well documented, but is poorly understood. The Arctic springtail *O. arcticus* employs the strategy known as cryoprotective dehydration to survive winter temperatures as low as -25°C. With this technique, the amount of available water in the body is reduced to almost zero and also there is an accumulation of trehalose, which acts as a cryo/anhydroprotectant. Although cryoprotective dehydration has been described in other insects, the molecular mechanisms behind this phenomenon are poorly understood.

A total of 16,379 EST clones were generated for *O. arcticus* and 1180 for *C. antarcticus*. This represents the first publicly available sequence data for this two species providing useful data for comparative genomic analysis. The fact that around 60% of the clones for both species

showed no sequence similarity to annotated genes in the datasets, suggests a specific pattern of gene expression in these species as adaptation to low temperatures.

Two microarrays were constructed to identify genes involved in surviving low temperatures, one for *C. antarcticus* by printing 672 clones in duplicate and the other for *O. arcticus* by printing 6912 clones in duplicate. An analysis of those where putative function could be inferred via database homology, in *C. antarcticus* there was a clear pattern of up-regulation of structural proteins being associated with the cold tolerant group. These structural proteins mainly comprised cuticle proteins and provide support for the recent theory that summer SCP variation within Collembola species could be a consequence of moulting, with moulting population having lowered SCPs. In *O. arcticus* EST and microarray analysis revealed clones and biochemical pathways associated with cryoprotective dehydration with a particular reference to genes involved in carbohydrate metabolism, aquaporin genes, heat shock proteins, LEA proteins and antioxidant enzymes.

AB

Accepted by the Scientific Board on: 13.11.2008.

ASB

Defended:

DE

Thesis defend board:

DB

President: dr Duško Blagojević, Principal Research Fellow, Institute for Biological Research "Siniša Stanković", Belgrade

Member: dr Gordana Grubor-Lajšić, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, mentor

Member: dr Branka Vasiljević, Principal Research Fellow, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, Belgrade