

Оригинални научни рад

ПОТЕНЦИЈАЛНА УЛОГА СА-ЗАВИСНИХ СИГНАЛНИХ ПУТЕВА У КРИОПРОТЕКТИВНОЈ ДЕХИДРАТАЦИЈИ АРКТИЧКЕ КОЛЕМБОЛЕ *MEGAPHORURA ARCTICA* – МИКРОЕРЕЈ АНАЛИЗА

Жељко Д. Поповић, Јелена Пураћ, Данијела Којић,
Елвира Памер, Гордана Грубор-Лајшић

Департман за биологију и екологију, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду, Трг Д. Обрадовића 2, 21000 Нови Сад*Контакт особа:

zeljko.popovic@dbe.uns.ac.rs

Abstract

POPOVIĆ D. Zeljko, Jelna PURAĆ, Danijela KOJIĆ, Elvira PAMER, Goradana GRUBOR-LAJŠIĆ: POTENTIAL ROLE OF Ca-DEPENDANT SIGNALING PATHWAYS IN CRYOPROTECTIVE DEHYDRATION OF ARCTIC SPRINGTAIL *Megaphorura arctica* – MICROARRAY ANALYSIS [Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg D. Obradovića 2, 21000 Novi Sad]

Insects of temperate and polar regions have evolved many adaptations that enable them to survive harsh winter temperatures. Collembolan species, Arctic springtail *Megaphorura arctica* employs strategy known as cryoprotective dehydration. At low temperatures, this species lose water through semi-permeable cuticle and maintain high osmolarity of body fluids which subsequently enable them to keep the body freezing temperature always below the ambient temperature. During dehydration this species also accumulates trehalose, an important cryo/anhydro protector. Physiological basis of this adaptation is well-exploited while its regulation is poorly understood. In order to better understand molecular basis of cryoprotective dehydration, 16379 ESTs (*Expressed Sequence Tags*) and cDNA microarray were constructed. Gene expression of 6912 clones in different experimental conditions was analysed. These sequences represent the first publicly available data for this species (<http://www.collembase.org/>).

EST and microarray analyses have revealed genes and biochemical pathways potentially involved in this cold hardiness. High expression of various genes whose protein products were similar to those involved in Ca-dependant signalling was observed. Some of the most abundant among detected proteins were: 1) enzymes of inositol phosphokinase and phosphatidylinositol phosphokinase family (metabolism of secondary messengers), 2) Ca-binding protein P22 (membrane traffic) and 3) calmodulin (which in complex with Ca^{2+} regulates the activity of various enzymes and proteins). Our results represent good base for further research on Ca-dependant signalling pathways involved in regulation of low temperature adaptations in *M. arctica* and other species, as well.

Key words: Collembola, low temperatures, Ca signaling, EST, microarray

Сажетак

Инсекти умерених и поларних подручја стекли су током еволутивног развоја бројне адаптације које им омогућују да преживе ниске температуре током зиме. Арктичка колембола *Megaphorura arctica* поседује стратегију познату као криопротективна дехидратација. На ниским температурама у присуству леда у окружењу, због разлике у притиску водене паре ова колембола постепено губи воду кроз полупропустљиву кутикулу. Последица је повећање осмоларности телесних течности и снижење температуре мржњења. Осим губитка воде, ова колембола синтетише и трехалозу која има улогу крио/анхидро протектора. Физиолошке основе ове адаптације су добро проучене, док су регулаторни механизми недовољно истражени. Са циљем бољег разумевања молекуларних механизма дехидратације, која је главна карактеристика криопротективне дехидратације конструисано је 16379 ЕСТ секвенци

(енгл. *Expressed Sequence Tag - EST*) и микроереј комплементарне ДНК (енгл. *cDNA microarray*) за праћење експресије 6912 клонова у различитим експерименталним условима. Ове секвенце представљају прве јавно доступне податке за *M. arctica* (<http://www.collembase.org/>).

Анализом EST секвенци и резултата микроереја идентификовани су гени и потенцијални биохемијски процеси укључени у криопротективну дехидратацију код ове врсте. Утврђена је повећана експресија више гена чији су протеински производи показали значајну сличност са протеинима укљученим у Са-зависни сигналинг. Идентификован је велики број протеина од којих посебно истичемо: 1) ензиме из фамилије инозитол фосфокиназа и фосфатидилинозитол фосфокиназа (метаболизам секундарних гласника) 2) калцијум везујући протеин П22 (мембрански транспорт) и 3) калмодулин (који у комплексу са Са²⁺ јонима регулише активности многобројних ензима и других протеина).

Наши резултати су основа за даља истраживања Са-зависних сигналних путева укључених у регулацију адаптација на ниске температуре, не само код ове него и код других врста.

Кључне речи: Collembola, ниске температуре, калцијум сигналинг, EST секвенце, микроереј

УВОД

Утицај абиотичких фактора и разумевање начина на који организми одговарају на промене у спољашњој средини током краћег или дужег временског периода су од великог значаја за еволуциону физиологију, екологију и конзервациону биологију, али и за многе примењене области науке. Инсекти умерених и поларних подручја стекли су током еволутивног развоја бројне адаптације које им омогућају да преживе ниске температуре током зиме. Арктичка колембола *Megaphorura arctica* (Tullberg, 1876), у литератури позната и под старим називом *Onychiurus arcticus*, је била предмет интензивних проучавања у протеклих десетак година (Clark и сар., 2007, 2009; Bahrndorff и сар., 2007, 2009; Worland, 1996; Worland и сар., 1998; Holmstrup и Somme, 1998). Ова врста користи стратегију познату као криопротективна дехидратација да преживи температуре које се зими спуштају и испод -25°C. На ниским температурама ова колембола, у присуству леда у окружењу, због разлике у притиску водене паре, контролисано губи воду кроз полупропустљиву кутикулу коцентрујући своје телесне течности и одржавајући телесну температуру мржњења нижом од амбијенталне (Holmstrup и Somme, 1998; Holmstrup и сар., 2002). Осим губитка воде ова колембола синтетише трехалозу која има улогу крио/анхидро протектора. На метаболички пут синтезе трехалозе указује брзо разлагање гликогена индукцијом дехидратације и повећање активности трехалозо 6-фосфат синтазе, кључног ензима синтезе трехалозе (Worland и сар., 1998). Процес криопротективне дехидратације је до данас описан само код неколико других врста: арктичке нематодe *Panagrolaimus davidi* (Wharton и сар., 2003, 2005), врсте *Fridericia ratzeli* (Pedersen и Holmstrup, 2003), ларве антарктичке врсте *Belgica antarctica* (Elmitsky и сар., 2008) и коконима *Dendrobaena octaedra* (Holmstrup и Westh, 1994).

Недавним пројектом који је обухватио генерисање око 16000 EST секвенци (енгл. *Expressed Sequence Tag - EST*) (Clark и сар., 2007) и микроереј анализу (Clark и сар., 2009), идентификовани су многи гени и ћелијски процеси који се налазе у основи криопротективне дехидратације код врсте *M. arctica*. Ове секвенце представљају прве јавно доступне податке за ову врсту (<http://www.collembase.org/>). Анализом клонова чија је експресија на микроереју била повећана током дехидратације, (било да је она изазвана излагањем ниским температурама било контролисаном влажношћу ваздуха) идентификован је већи број гена укључених у регулацију значајних ћелијских процеса као што су: синтеза и мобилизација трехалозе, заштита ћелијског система помоћу малих протеина топлотног стреса (енгл. *Heat Shock Proteins - HSPs*) и структурна реорганизација ћелија и ткива. Насупрот овим процесима, продукција енергије, иницијација протеинске транслације и ћелијске деобе као и

ткивни репарациони процеси су доминирали међу генима који су идентификовани током рехидратације. Иако су овим резултатима по први пут идентификовани гени и ћелијски процеси који су пружили увид у молекуларне основе и регулаторне механизме криопротективне дехидратације, потпуно разумевање овог комплексног процеса захтева додатне анализе. Описани експеримент због великог обима информација које пружа представља драгоцен извор података и основу за многа будућа истраживања.

Познато је да је Ca^{2+} веома важан ћелијски гласник укључен у регулацију основних ћелијских процеса као што су генска експресија и синтеза протеина. Такође, велики број различитих организама користи Са-сигналинга да иницира ћелијски одговор на различите врсте стреса у сопљашњој средини: укључујући високу и ниску температуру, сушу, топлотни и оксидативни стрес (Batiza и сар., 1996; Denis и Cyert, 2002; Giovine и сар., 2001; Ermak и Davies, 2001; Zhu, 2002). Резултати недавних истраживања су јасно показали да Ca^{2+} игра значајну улогу и код инсеката и то у брзом стицању отпорности на хладноћу врсте *Belgica antarctica* (Teets и сар., 2008).

Релативно ниска концентрација Ca^{2+} у цитосолу од око 100 nM (Clapham, 2007) одржава се активним пумпањем Ca^{2+} јона у ванћелијски простор или у унутарћелијске депое као што су ендоплазматични/саркоплазматични ретикулум и митохондрије, где представљају форму резерве овог јона. Осим јонских пумпи, неки протеини у цитосолу или ендоплазматичном ретикулуму везују Ca^{2+} и на тај начин одржавају његову актуелну концентарцију. Ово је од посебног значаја јер мале промене у концентрацији Ca^{2+} изазивају различите ћелијске одговоре. Пораст нивоа цитосолног Ca^{2+} може да настане након активације ИП3/ДАГ (инозитол 1,4,5-трифосфат/1,2-диацилглицерол) сигналног пута. Овај пут може бити стимулисан активацијом неког Г протеин зависног рецептора, као и неких других рецептора који воде до активације фосфолипазе Ц која разлаже ПИП2 (фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфат) до ДАГ и ИП3. ИП3 у цитосолу дифундује до ендоплазматског ретикулума, везује се за ИП3-зависне канале за Ca^{2+} на њиховој мембрани чиме се омогућава дифузија Ca^{2+} из ендоплазматичног ретикулума у цитосол. Повећање концентрације Ca^{2+} у цитосолу може да доведе до различитих одговора у ћелији. Могуће је да Ca^{2+} заједно са ДАГ-ом активира протеин киназу Ц у плазма мембрани која даље може да фосфорилише различите ћелијске ензиме и рецепторе мењајући њихову активност. Јони калцијума су укључени и у регулаторни систем гликоген киназне каскаде, а у комплексу са малим цитосолним протеином калмодулином мењају активност многих ензима и протеина, укључујући и калцијум/калмодулин зависне протеин киназе (Андрић и Костић, 2007).

Са циљем бољег разумевања молекуларних механизма криопротективне дехидратације код *M. arctica* као и потенцијалне улоге Ca^{2+} у овом процесу, у раду праћена је експресија неких клонова чији су протеински производи повезани са Са-сигналингом у ћелији.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИКА

Сакупљање експерименталних животиња и припрема за експеримент

Експерименталне животиње *Megaphorura arctica* су сакупљане у маховини и испод камења у обалским подручјима и у подножју литица насељених птицама у близини Новог Алесунда, Краљевина Норвешка, након чега су транспортоване у Британски институт за истраживање Антарктика у Кембриџу (енгл. *British Antarctic Survey*). Адултни и јувенилни облици су заједно чувани на 4°C, у пластичним кутијама са малим отвором на поклопцу за вентилацију. У кутијама се налазила маховина,

лишајеви и земља сакупљена на истом месту где и узорци. Редовно прскање водом обезбеђивало је неопходну влажност, а као храна је додаван суви пекарски квасац.

Конструкција, хибридизација и анализа резултата микроереја

Клонови коришћени за конструкцију микроереја комплементарне ДНК (енгл. *cDNA microarray*) су добијени из претходне ЕСТ анализе (Clark и сар., 2007) у којој је из пет експерименталних група животиња генерисано и анализирано 16379 ЕСТ секвенци које су послате у dbEST базу података (Boguski и сар., 1993). Приступни број за дате секвенце је 49109381-49125759 у dbEST бази или EW744731-EW761109 у GeneBank бази података.

Микроереј је конструисан штампањем 6912 комплементарних ДНК које су претходно амплификоване ПСР-ом. Из комплементарне ДНК библиотеке потпуно дехидратисаних колембола узето је 3840 клонова, а делимично дехидратисаних колембола 3072 клона. Све ДНК су штампане у дупликату на плочицу уз додатак контролних секвенци (*SpotReport Alien Array Validation System, Stratagene*). Конструкција и хибридизација микроереја су урађени по методи описаној у Clark и сар., 2009. Експериментални дизајн је подразумевао хибридизацију пет различитих третмана експерименталних група међусобно и заједно са контролном групом колембола. Урађено је шест биолошких и три техничка понављања. Припремљене су следеће групе експерименталних животиња за хибридизацију:

К) Контролне, живе колемболе, гајене на 4°C.

М2) Делимично дехидратисане колемболе, које су са почетне температуре од 4°C охлађене до -2°C стопом од 2°C недељно. Хлађене су у пластичним кутијама у којима се као подлога налазио влажни CuSO_4 помешан са активним угљем у односу 4:1. Финални садржај воде у овим колемболама је био $1,10 \pm 0,20$ g/g суве масе.

М7) Потпуно дехидратисане колемболе, које су са почетне температуре од 4°C охлађене до температуре од -7°C стопом од 2°C недељно (у истим условима као и М2 група). Финални садржај воде у овим колемболама је био $0,57 \pm 0,05$ g/g суве масе.

ПД) Делимично дехидратисане колемболе у условима константне релативне влажности ваздуха од 96 % (која је постигнута помоћу засићених раствора соли). Колемболе су дехидратисане у отприлике истој мери као и оне које су хлађене до температуре од -2°C. Финални садржај воде у овим колемболама је био $0,90 \pm 0,12$ g/g суве масе.

Д) Потпуно дехидратисане колемболе у условима константне релативне влажности ваздуха од 96 % (која је постигнута помоћу засићених раствора соли). Колемболе су дехидратисане у отприлике истој мери као и оне које су хлађене до -7°C. Финални садржај воде у овим колемболама је био $0,20 \pm 0,07$ g/g суве масе.

Х18) Рехидратисане колемболе, које су са температуре од -7°C остављене 18 часова на 4°C у присуству влаге да се рехидратишу.

Анализа резултата микроереја је описана у раду Clark и сар., 2009. Дизајну микроереја се може приступити у Array Express бази података (www.ebi.ac.uk/microarray-as/ae/) под бројем А-МEXP-1540 и Е-МEXP-2105.

РЕЗУЛТАТИ

Са циљем да се прати промена експресије гена током криопротективне дехидратације код *M. arctica*, на микроереј је хибридизована комплементарна ДНК из пет различитих експерименталних група колембола заједно са контролом, као и међусобно. Наша анализа у овом раду је била усмерена на идентификацију гена чији су протеински производи повезани са Са- зависним сигналингом у хелији, а чија се експресија статистички значајно мења између различитих група.

Идентификован је већи број оваквих гена у свим експерименталним групама, као и велики број протеина од којих посебно истичемо: 1) ензиме из фамилије инозитол фосфокиназа и фосфатидилинозитол фосфокиназа (метаболизам секундарних гласника) 2) калцијум везујући протеин П22 (мембрански транспорт) и 3) калмодулин (који у комплексу са Ca^{2+} јонима регулише активности многобројних ензима и других протеина). Део резултата приказан је у Табели 1 у којој су приказани клонови који су доминирали у свакој од пет експерименталних група Д, Х18, М2, М7, и ПД тј. клонови чија је експресија била статистички значајно повећана у датом третману у поређењу са другим третманима и контролом, а чији су протеински продукти потенцијално укључени у Са-сигналинг.

Табела 1. Клонови чија је експресија статистички значајно повећана у Д, Х18, М2, М7 и ПД третманима у поређењу са другим третманима и контролом, а чији су протеински продукти потенцијално укључени у калцијум зависни сигналинг код *M. arctica*.

БЛАСТ идентификација	Бласт аногација
Д	
Q8WVQ1 CANTI_HUMAN P36609 NCS2_CAEL Q5R7F0 CHP1_PONPY Q9WU49 CHSP1_RAT Q9R0I8 PI52A_RAT Q9ESM0 IP6K1_RAT Q64323 PIGA_MOUSE Q9U9P7 PITC1_DROME P53812 PIPNB_RAT O88763 PK3C3_RAT Q8R071 IP3KA_MOUSE Q8STF0 CALM_STRIE Q95221 IP6K2_RABIT O08586 PTEN_MOUSE	Солубилна калцијум-активирајућа нуклеаза 1 Неуронални калцијум сензор 2 (NCS-2) Калцијум везујући протеин П22 Калцијумом регулисан топлотно стабилни протеин 1 Фосфатидилинозитол-4-фосфат 5-киназа тип 2 алфа Инозитол хексафосфат киназа 1 Н-ацетилглюкозаминил-фосфатидилинозитол биосинтетички протеин Цитоплазматични фосфатидилинозитол трансфер протеин Фосфатидилинозитол трансфер протеин бета изоформа Фосфатидилинозитол 3-киназа каталитичка субјединица Инозитол-трисфосфат 3-киназа А Калмодулин Инозитол хексакисфосфат киназа 2 Фосфатидилинозитол-3,4,5-трисфосфат 3-фосфатаза
Х18	
Q10131 CEX1_CAEL Q95266 KCC2D_PIG O08586 PTEN_MOUSE P22700 ATC1_DROME P53812 PIPNB_RAT	Потенцијално калцијум везујући протеин цекс-1 Калцијум/калмодулин – зависна протеин киназа тип II делта субјединица Фосфатидилинозитол-3,4,5-трисфосфат 3-фосфатаза Калцијум- транспортујућа АТПаза саркопл./ендопл. ретикуларни тип Фосфатидилинозитол трансфер протеин бета изоформа
М2	
P04569 SCP1_BRALA Q8K4Y7 CANTI_RAT Q9WU49 CHSP1_RAT Q9R0I8 PI52A_RAT O88763 PK3C3_RAT P20456 IMPA1_BOVIN	Саркоплазматични калцијум-везујући протеин I, III и IV Солубилна калцијум активирајућа нуклеаза 1 Калцијумом регулисани топлотно стабилни протеин 1 Фосфатидилинозитол-4-фосфат 5-киназа тип-2 алфа Фосфатидилинозитол 3-киназа каталитичка субјединица Инозитол монофосфатаза
М7	
P04569 SCP1_BRALA Q9WU49 CHSP1_RAT Q9R0I8 PI52A_RAT P53812 PIPNB_RAT O88763 PK3C3_RAT Q8K4Y7 CANTI_RAT	Саркоплазматични калцијум-везујући протеин I, III и IV Калцијумом регулисани топлотно стабилни протеин 1 Фосфатидилинозитол-4-фосфат 5-киназа тип-2 алфа Фосфатидилинозитол трансфер протеин бета изоформа Фосфатидилинозитол 3-киназа каталитичка субјединица Солубилна калцијум активирајућа нуклеаза 1
ПД	
P22700 ATC1_DROME Q9WU49 CHSP1_RAT Q9R0I8 PI52A_RAT P53812 PIPNB_RAT P20456 IMPA1_BOVIN P04352 CALM_CHLRE	Калцијум- транспортујућа АТПаза саркопл./ендопл. ретикуларни тип Калцијумом регулисани топлотно стабилни протеин 1 Фосфатидилинозитол-4-фосфат 5-киназа тип-2 алфа Фосфатидилинозитол трансфер протеин бета изоформа Инозитол монофосфатаза Калмодулин

ДИСКУСИЈА

Активирање Са зависног сигналинга као одговора на различите врсте стреса у спољашњој средини, укључујући високу и ниску температуру, сушу, осмотски или оксидативни стрес, описан је код многих организама (Batiza и сар., 1996; Denis и Cyert, 2002; Giovine и сар., 2001; Ermak и Davies, 2001; Zhu, 2002).

Познато је да је код биљака флукс Ca^{2+} одговоран за отпочињање аклимације на хладноћу (Mongou и сар., 1993). Наиме, ниска температура смањује флуидност ћелијске мембране што дестабилизује актински цитоскелет доводећи до његове деполимеризације и даље до повећања цитосолног Ca^{2+} неколико секунди након излагања хладноћи (Orvar и сар., 2000). До повећања нивоа Ca^{2+} долази због његовог инфлуksа, како кроз плазма мембрану, тако и из унутарћелијских одељака (Knight и сар., 1996). При томе активирају се Са-зависне протеин киназе и транскрипциони фактори који даље регулишу протеине и гене који се активирају на ниским температурама. Улога актинског цитоскелета у смислу да доводи до отпуштања Ca^{2+} из унутарћелијских одељака описана је и у анималним ћелијама (Wu и сар., 1999), а и код инсеката предложен је сличан механизам. Познато је да излагање инсеката ниским температурама индукује промену у композицији и флуидности ћелијске мембране (Lee и сар., 2006; Michaud и Denlinger, 2006; Overgaard и сар., 2005) што би могло да олакша флукс Ca^{2+} из ванћелијских или унутарћелијских одељака преко интеракције са цитоскелетом и Ca^{2+} каналима. Значај Ca^{2+} у отпорности инсеката на ниске температуре није много изучаван. Недавно је показано да је Ca^{2+} неопходан за отпорности на ниске температуре код врсте *Belgica antarctica* (Teets и сар., 2008). Резултати указују да је флукс Ca^{2+} укључен у ћелијско регистровање хладноће и сигналну трансдукцију током брзог стицања отпорности на хладноћу, као и да је калмодулин интегрални део Са-сигналинга. Резултати овог рада по први пут указују на улогу Ca^{2+} и калмодулина у одговору на ниске температуре код инсеката. Поред ових истраживања, резултати микроереј анализе код *Sarcophaga crassipalpis* показали су да хладни третман индукује између осталог повећану експресију 13 сигналних трансдукционих молекула, посебно Са-везујућих и протеина повезаних са Г протеинским сигналингом (Michaud и Denlinger, 2004).

Резултати наших анализа су показали повећану експресију гена чији су продукти повезани са Са-сигналингом у различитим експерименталним групама током процеса криопротективне дехидратације код арктичке колемболе, што указује на одређену улогу Ca^{2+} у одговору на хладноћу код ове врсте. У овој анализи је помоћу кључних речи у БЛАСТ аотацијама претражен само део протеина који интерагују или су битни за метабилизам калцијума.

Посебно бисмо истакли повећану експресију гена чији је протеински продукт идентификован као калцијумом регулисан топлотно стабилан протеин 1 (Q9WU49|CHSP1_RAT), а који је имао повећану експресију у свим анализираним дехидратисаним групама колембола. Оно што је занимљиво је постојање хладног шок домена у овом протеину (енгл. *Cold Shock Domain - CDS*). Протеини са овим доменом представљају велику суперфамилију протеина, а домен је веома конзервисан од бактерија до човека, састоји се од око 70 аминокиселина и садржи мотиве за везивање нуклеинских киселина. Суперфамилија је класификована у 5 група, а до сада је описана структура само неколико бактеријских протеина (Weber и сар., 2002). Ови протеини су укључени у различите ћелијске процесе укључујући адаптацију на ниске температуре, ћелијски раст, недостатак нутријената и стационарну фазу (Grauman и Marahiel, 1998). Функционишу тако што утичу на секундарну структуру РНК, омогућују купловање транскрипције и транслације функционишу као транскрипциони активатори и слично. Иако постоји доста информација, већина карактеристика протеина ове фамилије тек треба да се истражи, стога овај ген представља занимљивог

кандидата за будућа истраживања криопротективне дехидратације. Поред овог гена, занимљива је и повећана експресија клона који потенцијално кодира калцијум везујући протеин P22 (Q5R7F0|CHP1_PONPY) у Д групи. Овај протеин садржи четири Са-везујућа домена (енгл. *EF hand domain*) карактеристична за велику фамилију Са-везујућих протеина. Неопходан је за конститутивни транспорт кроз мембрану, инхибира ГТП-азом стимулисану размену Na^+/H^+ , а инхибира и калцинеурин фосфатазну активност (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q5R7F0>).

Резултати анализе указују и на значај секундарних гласника који настају фосфорилацијом и дефосфорилацијом мембранског молекула фосфатидилинозитола, а називају се фосфоинозитиди у процесу који води криопротективној дехидратацији. Наше анализе показале су повећану експресију ензима из фамилије инозитол фосфокиназа и фосфатидилинозитол фосфокиназа у различитим експерименталним групама што указује на могућност активирања фосфоинозитидног сигналног пута који се разликује од ИП3/ДАГ сигналног пута (Андрић и Костић, 2007). Овај сигнални пут се активира регрутовањем ПИЗ-киназе (фосфатидилинозитол 3-киназе) и настанка ПИ-3 фосфата који су везани за плазма мембрану и представљају важно место за различите сигналне протеине који преносе сигнале у оквиру неколико значајнијих сигналних путева.

Потребно је нагласити да око 50% потенцијалних гена нису имали сличне секвенце у базама података. Могуће је да су неки од њих укључени у Са-зависни сигналинг у процесима карактеристичним за испитиване експерименталне групе, међутим детаљније анализе, као и добијање секвенци пуне дужине су неопходни за потенцијалну идентификацију домена и додељивање функција. Такође је потребно нагласити да промене у транскрипционом нивоу иРНК не указују увек на промене на протеинском нивоу, међутим представљају индикатор ћелијских процеса који су изазвани експерименталним условима који се анализирају.

ЗАКЉУЧАК

Микроереј анализа се показала као моћна техника за разумевање процеса и гена укључених у криопротективну дехидратацију. Идентификован је одређен број гена за протеине повезане са метаболизмом калцијума који представљају обећавајуће кандидате за будуће функционалне анализе и боље разумевање ћелијске дехидратације. Наши резултати су основа за даља истраживања Са-зависних сигналних путева укључених у регулацију адаптација на ниске температуре, не само код *M. arctica* него и код других врста.

ЗАХВАЛНИЦА

Ова истраживања су подржана од стране пројеката Sleeping Beauty Consortium: Specific Targeted Research Project, Contract no 012674 (NEST) и пројекта Министарства за науку и заштите животне средине Републике Србије број 173014 („Молекуларни механизми редокс сигналинга у хомеостази, адаптацији и патолошким процесима“)

ЛИТЕРАТУРА

1. <http://www.collembase.org/>
2. www.ebi.ac.uk/microarray-as/ae/
3. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q5R7F0>
4. Андрић, С., Т.Костић (2007) : Механизми ћелијске комуникације. Скрипта. WUS Austria.

5. Bahrndorff, S., S.O., Petersen, V., Loeschcke, J., Overgaard, M. Holmstrup (2007): Differences in cold and drought tolerance of high arctic and sub-arctic populations of *Megaphorura arctica* Tullberg 1986 (Onychiuridae: Collembola). *Cryobiology*, 55: 315-323.
6. Bahrndorff, S., A. Tunnacliffe, M.J. Wise, B. McGee, M. Holmstrup, V. Loeschcke (2009): Bioinformatics and protein expression analyses implicate LEA proteins in the drought response of Collembola. *Journal of Insect Physiology*, 55: 210-217.
7. Batiza, A.F., T. Schulz, P.H. Masson (1996): Yeast respond to hypotonic shock with a calcium pulse. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 23357-23362.
8. Boguski, M.S., T.M. Lowe, C.M. Tolstoshev: dbEST--database for "expressed sequence tags". *Nature Genetics*, 4: 332-333, 1993.
9. Clapham, D.E. (2007): Calcium Signaling. *Cell*, 131: 1047-1058.
10. Clark, M.S., M.A.S. Thorne, J. Purać, G. Grubor-Lajšić, M. Kube, R. Reinhardt, M.R. Worland (2007) : Surviving extreme polar winters by desiccation: clues from Arctic springtail (*Onychiurus arcticus*) EST libraries. *BMC Genomics*, 8: 475.
11. Clark, M.S., M.A.S. Thorne, J. Purać, G. Burns, G. Hillyard, Z.D. Popović, G. Grubor-Lajšić, M.R. Worland (2009): Surviving the cold: molecular analyses of insect cryoprotective dehydration in the Arctic springtail *Megaphorura arctica* (Tullberg). *BMC Genomics*, 10: 328.
12. Denis, V., M.S. Cyert (2002): Internal Ca²⁺ release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue. *Journal of Cell Biology*, 156: 29-34.
13. Elnitsky, M.A., S.A. Hayward, J.P. Rinehart, D.L. Denlinger, R.E. Lee (2008): Cryoprotective dehydration and the resistance to inoculative freezing in the Antarctic midge, *Belgica antarctica*. *Journal of Experimental Biology*, 211: 524-530.
14. Ermak, G., K.J.A. Davies (2001): Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Molecular Immunology*, 38: 713-721.
15. Giovine, M., M. Pozzolini, A. Favre, G. Bavestrello, C. Cerrano, F. Ottaviani, L. Chiarantini, A. Cerasi, M. Cangiotti, E. Zocchi, S. Scarfi, M. Sara, U. Benatti (2001): Heat stress-activated calcium-dependent nitric oxide synthase in sponges. *Nitric Oxide*, 5: 427-431.
16. Graumann, P. L., M.A. Marahiel (1998): A superfamily of proteins containing the cold shock domain. *Trends in Biochemical Science*, 23: 286-290.
17. Holmstrup, M., L. Sømme (1998): Dehydration and cold hardiness in the Arctic collembolan *Onychiurus arcticus* Tullberg 1876. *Journal of Comparative Physiology B*, 168: 197-203.
18. Holmstrup, M., P. Westh (1994): Dehydration of earthworm cocoons exposed to cold: a novel cold hardiness mechanism. *Journal of Comparative Physiology B*, 164: 312-315.
19. Holmstrup, M., M. Bayley, H. Ramløv (2002): Supercool or dehydrate? An experimental analysis of overwintering strategies in small permeable arctic invertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 5716-5720.
20. Knight, H., A.J. Trewavas, M.R. Knight (1996): Cold calcium signaling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *Plant Cell*, 8: 489-503.

21. Lee, R.E., K. Damodaran, S.X. Yi, G.A. Lorigan (2006): Rapid cold-hardening increases membrane fluidity and cold tolerance of insect cells. *Cryobiology*, 52: 459–463.
22. Michaud, M.R., D.L. Denlinger (2004): Molecular modalities of insect cold survival: current understanding and future trends. *International Congress Series*, 1275: 32–46.
23. Michaud, M.R., D.L. Denlinger (2006): Oleic acid is elevated in cell membranes during rapid cold-hardening and pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Journal of Insect Physiology*, 52: 1073–1082.
24. Monroy, A.F., F. Sarhan, R.S. Dhindsa (1993): Cold-induced changes in freezing tolerance, protein phosphorylation, and gene expression (evidence for a role of calcium) *Plant Physiology*, 102: 1227–1235.
25. Orvar, B.L., V. Sangwan, F. Omann, R.S. Dhindsa (2000): Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant Journal*, 23: 785–794.
26. Overgaard, J., J.G. Sorensen, S.O. Petersen, V. Loeschcke, M. Holmstrup (2005): Changes in membrane lipid composition following rapid cold hardening in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 51: 1173–1182.
27. Pedersen, P.G., M. Holmstrup (2003): Freeze or dehydrate: only two options for the survival of subzero temperatures in the arctic enchytraeid *Fridericia ratzeli*. *Journal of Comparative Physiology B*, 173: 601–609.
28. Teets, N. M., M. A. Elnitsky, J. B. Benoit, G. Lopez-Martinez, D. L. Denlinger, R. E., Lee (2008): Rapid cold-hardening in larvae of the Antarctic midge *Belgica antarctica*: cellular cold-sensing and a role for calcium. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 294: R1938–R1946.
29. Weber, M.H.C., Fricke, I., Doll, N., Marahiel, M.A (2002): CSDBase: an interactive database for cold shock domain-containing proteins and the bacterial cold shock response. *Nucleic Acids Research*, 30: 375 – 378,.
30. Wharton, D.A., Goodall, G., Marshall, C.J. (2003): Freezing survival and cryoprotective dehydration as cold tolerance mechanisms in the Antarctic nematode *Panagrolaimus davidi*. *Journal of Experimental Biology*, 206: 215–221.
31. Wharton, D.A., Downes, M.F., Goodall, G., Marshall, C.J. (2005): Freezing and cryoprotective dehydration in an Antarctic nematode (*Panagrolaimus davidi*) visualized using a freeze substitution technique. *Cryobiology*, 50: 21–28.
32. Worland, M.R. (1996): The relationship between water content and cold tolerance in the Arctic collembolan *Onychiurus arcticus* (Collembola: Onychiuridae). *European Journal of Entomology*, 93: 341–348.
33. Worland, M.R., Grubor-Lajšić, G., Montiel, P.O. (1998): Partial desiccation induced by sub-zero temperatures as a component of the survival strategy of the Arctic collembolan *Onychiurus arcticus* (Tullberg). *Journal of Insect Physiology*, 44: 211–219.
34. Wu, Z., Wong, K., Glogauer, M., Ellen, R.P., McCulloch C.A.G. (1999): Regulation of stretch-activated intracellular calcium transients by actin filaments. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 261: 419–425.
35. Zhu, J.K. (2002): Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 53: 247–273.

Примљено: 30.12.2010.

Одобрено: 21.07.2011.