

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Željko D. Popović

**MOLEKULARNA I BIOHEMIJSKA  
OSNOVA DIJAPAUZE KUKURUZN  
PLAMENCA *Ostrinia nubilalis* (Hbn.)  
(Lepidoptera: Pyralidae)**

doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Željko D. Popović

**MOLECULAR AND BIOCHEMICAL  
BASIS OF DIAPAUSE OF EUROPEAN  
CORN BORER *Ostrinia nubilalis* (Hbn.)  
(Lepidoptera: Pyralidae)**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2014

## **PODACI O MENTORIMA I ČLANOVIMA KOMISIJE**

### **MENTORI**

**dr Ratko Radojičić,**  
**redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu**

**dr Gordana Grubor-Lajšić,**  
**redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u**  
**Novom Sadu**

### **ČLANOVI KOMISIJE**

**dr Duško Blagojević,**  
**naučni savetnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša**  
**Stanković“ Univerziteta u Beogradu**

**dr Ljubiša Stanisavljević,**  
**vanredni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu**

**dr Jelena Purać,**  
**docent Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom**  
**Sadu**

Datum odbrane: \_\_\_\_\_ 2014.

# *Zahvalnica*

*Ova disertacija je realizovana u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja br. 173014 „Molekularni mehanizmi redoks signalinga u homeostazi, adaptaciji i patologiji“ i pomoću stipendije **Međunarodnog Višegradskog Fonda** (International Visegrad Fund) za jednogodišnji istraživački boravak u Biološkom centru Češke akademije nauka u Češkim Budjevicama.*

*Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru **prof. dr Gordani Grubor-Lajšić** zbog ukazanog poverenja, bezrezervne podrške i razumevanja. Hvala Vam i kao profesoru i kao dobrom čoveku. Svom drugom mentoru, **prof. dr Ratku Radojičiću**, najsrdačnije se zahvaljujem na lepoj saradnji i korisnim savetima pri pisanju disertacije.*

***Prof. dr Ljubiši Stanisavljeviću** zahvaljujem se na konstruktivnim savetima, a **dr Dušku Blagojeviću** i **prof. dr Mihajlu Spasiću** na velikoj pomoći i podršci tokom svih godina naše saradnje.*

*Zahvaljujem se **prof. dr Vladimiru Košćalu** iz Instituta za entomologiju Biološkog centra Češke akademije nauka na velikoj časti da radim u njegovoj laboratoriji, na savetima i veštinama koje je bezrezervno podelio sa mnom, kao i na gostoprimstvu tokom boravka u Češkoj. Zahvalnost dugujem i **doc. dr Vitjeslavu Majeru** iz Laboratorije za elektromigracione metode, PMF-a, Univerziteta „Palacki“ u Olomoucu, Češka republika, na pomoći pri radu na kapilarnoj elektroforezi, kao i **dr Snežani Gošić-Dondo** iz Instituta za kukuruz „Zemun Polje“ na biološkom materijalu.*

*Mojim dragim kolegincama, **doc. dr Danijeli Kojić** i **doc. dr Jeleni Purać**, zahvaljujem se na dugogodišnjoj podršci, lepoj saradnji i korisnim savetima koji su doprineli da ova teza bude bolja. **Snežani Milovac**, **Elviri Vukašinović** i **Ani Blanuši** dugujem posebnu zahvalnost na pomoći pri sakupljanju biološkog materijala na terenima, održavanju kulture insekata i postavci eksperimenata.*

***Jeleni Lujić**, dragoj koleginci i prijatelju, zahvaljujem se na bezrezervnoj podršci tokom svih godina našeg druženja.*

*Veliku zahvalnost dugujem i vrednim studentima koji su mi pomagali tokom eksperimentalnog rada na disertaciji i bili mi velika inspiracija. Koleginicama **Tatjani Nikolić** i **Ani Subotić** se zahvaljujem na predanom radu, strpljenju i veri koje su imale u naš mali tim u Češkim Budjejevicama. Zahvalnost dugujem **Željki Brkić**, **Alisi Bošnjak**, **Milanu Đilasu** i **Darku Častvenu** na lepoj i konstruktivnoj saradnji, a **Ivi Uzelac** na pomoći oko gramatičkih i stilskih nedoumica, korisnim savetima i sugestijama tokom pisanja. Bila mi je velika čast sarađivati sa Vama!*

*Zahvalnost dugujem porodici moje supruge na pomoći, razumevanju i podršci u proteklih pet godina.*

*Posebnu i duboku zahvalnost dugujem svojoj porodici – roditeljima, braći i sestrama. Hvala vam na svemu, bogatstvo je imati vas kraj sebe.*

*Mojim najmilijima, **Vesni**, **Stefanu** i **Jeleni**, ne postoji način na koji mogu da se zahvalim za sve – za ljubav, brigu, radost, suze i smeh. Ne postoji način na koji vam mogu nadoknaditi sate i dane provedene bez mene, niti postoje reči kojima bih mogao opisati sreću što vas imam...*

*Željko*

*The sea is flowing ever,  
The land retains it never.*

*Johann Wolfgang von Goethe*

## Molekularna i biohemijska osnova dijapauze kukuruznog plamenca

### *Ostrinia nubilalis* (Hbn.) (Lepidoptera: Pyralidae)

#### Rezime

Dijapauza je period zaustavljenog razvoja kod insekata, drugih zglavkara i određenih vrsta riba, a koja se javlja na određenom, za svaku vrstu karakterističnom, razvojnom stadijumu. Dijapauzu, kao dugotrajnu i „skupu“ fazu mirovanja, karakteriše prilagođavanje organizma na molekularnom, fiziološkom, morfološkom i bihevioralnom nivou. Promene koje karakterišu dijapauzu većine vrsta su supresija metabolizma, zaustavljanje ili usporavanje razvića, izmenjena ekspresija gena, sinteza zaštitnih proteina i metabolita koji vode ka povećanju otpornosti organizma. Sposobnost insekata da prežive dugotrajne nepovoljne periode u stanju dijapauze omogućila im je da koriste sezonski uslovljene resurse, kolonizuju raznovrsna staništa, smanjuju ukrštanje u srodstvu i povećavaju genetičku raznovrsnost. S obzirom na ogroman značaj dijapauze u životnom ciklusu insekata, ali i drugih organizama, bilo kakvo odlaganje ili njeno prerano prekidanje može imati negativne posledice na njihovo preživljavanje. Iz tog razloga, bolje poznavanje biološke osnove dijapauze može omogućiti unapređenje kontrole insekatskih vrsta koje nanose ekonomsku štetu u poljoprivredi, ali i poboljšanje metoda gajenja vrsta koje su korisne (bumbari, pčele, svilena buba, bubamare, parazitske osice i druge). Takođe, razumevanje mehanizama otpornosti i zaštite od stresa, npr. na niske temperature, mogu doprineti razvoju novih tehnika za krioprezervaciju organa i tkiva. Na kraju, insekti koji miruju, zbog specifičnosti metaboloma, mogu biti potencijalan izvor novih lekova, ali i dobri modeli za istraživanje starenja, gojaznosti i dijabetesa.

Kukuruzni plamenac *Ostrinia nubilalis* (Hübner 1796) je vrsta moljca čije su larve polifagne herbivore koje se hrane na preko 200 biljnih vrsta, uključujući važne poljoprivredne useve, povrće i voće. Krajem leta i početkom jeseni larve 5. stupnja ulaze u fakultativnu dijapauzu, preživljavajući oštre kontinentalne zime u fazi mirovanja. Tokom dijapauze gusenice *O. nubilalis* razvijaju otpornost na niske temperature i sposobnost da prežive zamrzavanje vanćelijskih telesnih tečnosti,

što je omogućilo ovoj vrsti da nastani ogromna prostranstva Evroazije, ali i da nepažnjom čoveka nasele Severnu Ameriku. Cilj ove doktorske disertacije je bio da se doprinese boljem razumevanju molekularno-biološke i biohemijske prirode dijapauze kukuruznog plamenca *O. nubilalis*.

Larvalna dijapauza je inicirana u laboratorijskim uslovima pod ravnodnevnim svetlosnim režimom (12:12=svetlo:tama) i na temperaturi od 22°C, dok su nedijapauzirajuće larve (ND) i lutke gajene u dugom fotoperiodu koji pogoduje aktivnom razvoju (18:6=svetlo:tama) i na temperaturi od 22°C. Predijapauzirajuća grupa (PD), larve 5. stupnja koje su prestale da se hrane i ušle u fazu lutanja, podeljena je u dve podgrupe – gusenice koje su ostavljene da uđu u dijapauzu na 22°C (D2t grupa) i gusenice koje su postepeno aklimatizovane tokom dve nedelje do temperature od 5°C, na kojoj su čuvane dva, četiri ili šest meseci (D2, D4, D6). Metaboličke promene – sadržaj nukleotida i koenzima, aktivnost citohrom *c* oksidaze (COX), sadržaj i promet vode određeni su kapilarnom elektroforezom, spektroskopskom metodom i diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom. Ekspresija odabranih gena je praćena metodom kvantitativne lančane polimeraze u realnom vremenu (Q-PCR). Apoptoza je analizirana fluorescentnom mikroskopijom (DAPI bojenje), esejom fragmentisanosti DNK i fluorimetrijskim određivanjem aktivnosti kaspaza u homogenatima larvi i lutki.

Rezultati kapilarne elektroforeze, aktivnosti COX, kao i ekspresije odabranih gena za subjedinice respiratornog lanca pokazali su da je metabolizam intenzivniji kod gusenica koje su gajene na 22°C (ND, PD i D2t), a niži kod onih koje su bile aklimatizovane na 5°C, naročito u početnim mesecima dijapauze. Sa druge strane, rezultati gravimetrijske analize i diferencijalne skenirajuće kalorimetrije pokazali su da je gubitak vode manji u larvama koje su u dijapauzi na nižoj temperaturi, u odnosu na larve u dijapauzi na višoj temperaturi, kao i da u tkivima opada sadržaj osmotski aktivne, a raste sadržaj osmotski neaktivne vode. Ekspresija većine analiziranih gena u vezi sa odgovorom na stres (različiti proteini toplotnog stresa, feritin, metalotionein, glutaredoksin) povećava se u dijapauzi, sem na samom početku dijapauze, kada je najčešće ili nepromenjena ili smanjena u odnosu na nedijapauzirajuću grupu. Bojenje fluorescentnom DAPI bojom nije pokazalo



apoptotske morfološke promene u tkivima dijapauzirajućih larvi. Nasuprot tome, Sa druge strane, fluorimetrijska merenja su utvrdila postojanje a) umerene aktivnosti enzima sličnih inicijatorskim kaspazama 9 i 8 u dijapauzirajućim larvama, b) visoku aktivnost kaspazi 8 sličnih enzima u nedijapauzirajućim larvama i c) veoma visoku aktivnost izvršne kaspaze 3 u lutkama.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se dužina trajanja dijapauze i temperatura na kojoj su gusenice aklimatizovane odražavaju na promene u energetsom metabolizmu, prometu vode, ekspresiji gena odgovornih za zaštitu od stresa i inicijaciji apoptoze. Najintenzivnije promene se događaju u početnim mesecima dijapauze i ogledaju se u supresiji intenziteta metabolizma, razvoju mehanizama za očuvanje vode i otpornost na temperaturni stres. Gusenice koje su u dijapauzi na nižoj temperaturi su bolje adaptirane za preživljavanje dužeg perioda mirovanja, jer imaju veću supresiju metabolizma, razvijaju zaštitne mehanizme koji im omogućavaju bolju kontrolu prometa vode, a verovatno pomažu i u regulaciji ćelijske smrti. Sa druge strane, gusenice koje su u dijapauzi na visokoj temperaturi su pod intenzivnijim stresom, imaju previše intenzivan metabolizam za fazu mirovanja, prebrzo troše metaboličke rezerve i gube vodu, što dovodi do povećane smrtnosti i preranog okončanja dijapauze. Na osnovu ovoga može se zaključiti da je izlaganje niskim temperaturama neophodno za dugoročno preživljavanje tokom dijapauze kukuruznog plamenca.

**Ključne reči:** dijapauza, *Ostrinia nubilalis*, hipometabolizam, stres, dehidracija, ekspresija gena, apoptoza

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Molekularna biologija i fiziologija

**UDK:** 577:[595.78:591.543.42](043.3)

## **Molecular and biochemical basis of diapause of European corn borer**

### ***Ostrinia nubilalis* (Hbn.) (Lepidoptera: Pyralidae)**

#### **Abstract**

Diapause is a carefully regulated state of arrested development that occurs at a species-specific life stage of insects, other arthropods and some fish species. It engages a plethora of molecular, physiological, morphological and behavioral changes that altogether increase stress tolerance and the ability to survive. Thus, diapause enables insects to exploit seasonally variable food resources and colonize new habitats, as well as decrease inbreeding and increase mating of temporally separated genotypes in a population. Due to the tremendous importance of diapause for survival, any factors that delay or perturb diapause can potentially compromise the fitness of an organism. Thus, deeper knowledge of the biology of diapause could help improve or develop new means of pest control for insect populations, as well as to advance current rearing techniques of beneficial species (bees, ladybirds, parasitic wasps, silkworm etc.). Additionally, defining the molecular background of stress tolerance during diapause, such as cold hardiness, could improve techniques for cryopreservation of organs, tissues and cells. Also, because of the specificity of the metabolom, diapausing insects could be regarded as a potentially rich source of new pharmaceutical agents, or could be used as model organisms to study ageing, obesity and diabetes.

The European corn borer (ECB), *Ostrinia nubilalis* (Hübner 1796), is a pest moth species whose polyphagous larvae feed on more than 200 plants, including important crops, vegetables and fruits. In late August or the beginning of September, because of a critical shortening of the photoperiod, 5<sup>th</sup> instar larvae of ECB stop feeding and enter into diapause. Diapausing larvae gradually develop freeze tolerance and become cold hardy, which has enabled this species to successfully colonize temperate regions. The aim of this dissertation was to improve our understanding of the molecular and biochemical mechanisms governing diapause of *O. nubilalis*.

Non-diapausing larvae and pupae were reared at 22°C under a long photoperiod of 18L:6D, while diapause was induced at 22°C, but under a photoperiod of 12L:12D. Pre-diapausing larvae (PD) that entered into the 5<sup>th</sup> Instar wandering stage were split into two groups – one left to diapause at 22°C (D2t) and another that was gradually acclimated to 5°C and left to diapause for two, four and six months (D2, D4, D6). Molecular and biochemical changes during diapause were assessed by measuring: a) the content of nucleotides and co-enzymes by capillary electrophoresis, b) activity of cytochrome-*c* oxidase by spectrophotometry, c) water content and supercooling points using differential scanning calorimetry (DSC) and d) gene expression using quantitative PCR (Q-PCR). Apoptosis was examined using fluorescence microscopy (DAPI staining), DNA laddering assay and measuring the activity of selected caspases using fluorimetric substrates.

Results show little or no difference between non-diapausing or pre-diapausing groups, while diapausing groups did differ, depending on the temperature and period of diapause. Generally, metabolism was high in groups reared at 22°C (ND, PD, D2t) and more suppressed in groups reared at 5°C (D2-6), especially in the beginning of diapause (D2). On the contrary, water loss was lower in cold-acclimated diapausing larvae (D2, D4, D6) in comparison to the warm acclimated group (D2t). In addition, the content of osmotically active (OA) water was decreased and osmotically inactive (OI) water was increased in larval tissues during diapause. Expression of stress-related genes was mostly up-regulated in the D2t group, suppressed in the D2 group and was gradually increased during diapause, from D2 to D6. DAPI staining did not reveal morphological signs of apoptosis in tissues of diapausing larvae. On the other hand, fluorimetric analysis of selected caspases showed: a) the presence of moderate activity of initiator caspases (casp-9 and -8) in diapausing larvae, b) high activity of caspase-8 in non-diapausing larvae and c) very high activity of effector caspase-3 in pupae.

The following conclusions can be drawn from the study of larval diapause of *Ostrinia nubilalis*: a) diapause in this species is not static but rather a dynamic event encompassing various biochemical and molecular mechanisms b) energy metabolism, water management, gene expression and apoptotic processes differ

depending on the temperature and period larvae spend in diapause, c) the most dramatic changes occur in the beginning of diapause and differ tremendously among cold and warm acclimated diapausing larvae, d) larvae that were cold acclimated suppressed metabolism more significantly, efficiently preserved energy and water, and e) warm acclimated larvae less successfully suppressed metabolism, lose energy and water faster, which altogether leads to a state of increased stress, high mortality and premature exit from diapause in this group.

Based on these results, low temperature exposure of *O. nubilalis* larvae in diapause initiates a set of molecular and biochemical processes that are vital for diapause endurance as well as successful resumption of further development.

**Keywords:** diapause, *Ostrinia nubilalis*, hypometabolism, stress, dehydration, gene expression, apoptosis

**Scientific field:** Biology

**Narrower scientific field:** Molecular biology and physiology

**UDC:** 577:[595.78:591.543.42](043.3)

## Spisak skraćenica

### A

**ADP** – adenzin-difosfat

**ADS** – sistem antioksidativne zaštite,  
*engl.* antioxidative defense system

**AFP** – antifriz protein

**AMP** – adenzin-monofosfat

**AMPK** –protein kinaza aktivirana  
AMP-om, *engl.* AMP activated protein  
kinase

**AMV RT** – reverzna transkriptaza  
ptičijeg virusa, *engl.* Avian  
Myeloblastosis Virus Reverse  
Transcriptase

**ANOVA** – statistička metoda za  
analizu varijanse

**ANT** – prenosilac adenin nucleotida  
*engl.* adenine nucleotide translocator

**Apaf** – protein apoptozomskog  
kompleksa, *engl.* apoptotic protease  
activating factor

**ATP** – adenzin-trifosfat

### B

**Bach- 1** – transkripcioni faktor, *engl.*  
BTB and CNC homology 1

**Bad** – proapoptotski protein, *engl.*  
Bcl-2-associated death promoter

**Bak** – proapoptotski protein, *engl.*  
Bcl-2 homologous antagonist/killer

**Bax** – proapoptotski protein, *engl.*

Bcl-2--associated X protein

**Bcl-2** – familija pro- i antiapoptotskih  
proteina, *engl.* B-cell lymphoma 2

**BH** – domen proteina iz familije Bcl-2

**Bid** – proapoptotski protein, *engl.*

BH3 interacting-domain death  
agonist

### C

**CARD** – domen za aktivaciju i  
regrutovanje kaspaza, *engl.* the  
caspase activation and recruitment  
domain

**CAT** – katalaza, *engl.* catalase

**cdc** – ciklin zavisna kinaza, *engl.*  
cyclin-dependent kinase

**CE** – kapilarna elektroforeza, *engl.*  
capillary electrophoresis

**cGMP** –ciklični gvanozin-monofosfat

**CHAPS** – cviterjonski deterdžent,  
*engl.* 3-[(3-Cholamidopropyl)di-  
methylammonio]-1-propanesulfonate

**COX** – citohrom *c* oksidaza

**CTAB** – cetil-trimetil-amonijum  
bromid

## D

**D2** – eksperimentalna grupa, gusenice dva meseca u dijapauzi na 5°C

**D2t** – eksperimentalna grupa, gusenice dva meseca u dijapauzi na 22°C

**D4** – eksperimentalna grupa, gusenice četiri meseca u dijapauzi na 5°C

**D6** – eksperimentalna grupa, gusenice šest meseci u dijapauzi na 5°C

**Damm** – izvršna kaspaza vinske mušice, *engl.* death associated molecule related to Mch2

**DAPI** – fluorescentna boja, 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidrohlorid

**Dcp1** – izvršna kaspaza vinske mušice, *engl.* death caspase-1

**DD** - citozinom-bogat domen receptora smrti, *engl.* death domain

**Decay** – izvršna kaspaza vinske mušice, *engl.* death executioner caspase related to Apopain/Yama

**DED** - efektorni domen kaspaza, *engl.* death effector domain

**DEPC** – dietil-pirokarbonat

**DEVD** – tetrapeptid, (Asp-Glu-Val-Asp)

**dFADD** – adaptorni protein kaspaza vinske mušice, *engl.* Drosophila Fas associated

**DIAP** – inhibitorni protein apoptoze kod *D. melanogaster*

**DISC** – kompleks za aktivaciju kaspaze-8, *engl.* death-inducing signaling complex

**dNTP** – dezoksiribonukleotid

**DR** – receptor smrti, *engl.* death receptors

**Dredd** – inicijatorska kaspaza vinske mušice, *engl.* death related ced-3/Nedd2-like

**Drice** – izvršna kaspaza vinske mušice, *engl.* Drosophila melanogaster ICE/CED-3-related protease

**Dronc** – inicijatorska kaspaza vinske mušice, *engl.* Drosophila melanogaster NEDD2-like caspase

**DSC** – diferencijalna skenirajuća kalorimetrija, *engl.* differential scanning calorimetry

**DTT** – di-tiotreitol

**DW** – suva masa, *engl.* dry weight

## E

**E.C.** – energetski naboj, *engl.* energy charge

**EDTA** – etilen diamin tetra sirćetna kiselina, *engl.* Ethylenediamine-tetraacetic acid

**EGTA** – etilenglikol-tetrasirćetna kiselina, *engl.* ethylene glycol tetraacetic acid

**ER** – endoplazmatski retikulum

**EST** –DNK sekvenca dobijena sekvenciranjem dèla

komplementarne DNK, *engl.* expressed sequence tag

## F

**FADH<sub>2</sub>** – flavin adenin dinukleotid

**Fer** – feritin

**FW** – sveža masa, *engl.* fresh weight

## G

**GABA** –  $\gamma$ -aminobuterna kiselina

**GDP** – gvanozin-difosfat

**GMP** – gvanozin-monofosfat

**GPx** – glutation peroksidaza, *engl.* glutathione peroxidase

**GR** – glutation reduktaza

**Grx** – glutaredoksin, *engl.* glutaredoxin

**GSSG/GSH** – glutation (oksidovan/redukovan)

**GST** – glutation S-transferaza

**GTP** – gvanozin-trifosfat

## H

**HEPES** – cviterjonski pufer, 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina

**Hip** – Hsp-interagujući protein

**Hop** – Hsp-organizujući protein

**HSE** – regulatorna DNK sekvenca gena za Hsp, *engl.* heat shock element

**HSF** – transkripcioni faktor gena za Hsp, *engl.* heat shock factor

**Hsp** – protein toplotnog stresa, *engl.* heat shock proteins

## I

**IAP** – inhibitorni proteini apoptoze, *engl.* inhibitor of apoptosis protein

**InsP<sub>3</sub>R** – receptor inozitol-1,4,5-trifosfata

**IRE** – regulatorna sekvenca na iRNK čiji produkti (proteini) su u vezi sa metabolizmom gvožđa, *engl.* iron responsive elements

**IRP** – regulatorni protein koji učestvuje u metabolizmu gvožđa, *engl.* iron responsive protein

## J

**JH** – juvenilni hormon

## L

**L** – eksperimentalna grupa, lutke

**LEA** – proteini kasne faze embriogeneze, *engl.* late embriogenesis abundant proteins

## M

**MOMP** – permeabilizacija spoljašnje membrane mitohondrija, *engl.* mitochondrial outer membrane permeabilization

**MOPS** – pufer, *engl.* 3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid

**MPTP** – pore na membrani mitohondrija, *engl.* mitochondrial permeability transition pore

**MRE** – regulatorna DNK sekvenca gena za Mtn, *engl.* metal response elements

**MTF** – transkripcioni faktor gena za Mtn, *engl.* MRE-binding transcription factor

**Mtn** – metalotionein

**mTOR** – proteinski kompleks sisara, *engl.* mammalian target of rapamycin

## N

**NAD<sup>+</sup>/NADH** – nikotinamid adenin dinukleotid (oksidovani/redukovani)

**NADP<sup>+</sup>/NADPH** – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (oksidovan/redukovan)

**ND** – eksperimentalna grupa, nedijapauzirajuće gusenice

**NF-κB** – transkripcioni faktor koji se aktivira spoljašnjim putem apoptoze, *engl.* nuclear factor-κB

## O

**OA** – slobodna, osmotski aktivna voda, *engl.* osmotically active

**OD** – optička gustina, *engl.* optical density

**OI** – vezana, osmotski neaktivna voda, *engl.* osmotically inactive

## P

**p27/p53** – proteini regulatori ćelijskog ciklusa

**PARP** – Poli-ADP riboza polimeraza, *engl.* Poly (ADP-ribose) polymerase

**PCA** – statistička metoda analize glavnih komponenti, *engl.* principal component analysis

**PCI** – smeša fenola, hloroforma i izoamil-alkohola, *engl.* Phenol-Chloroform-Isoamyl Alcohol

**PCNA** – jedarni antigen ćelije u deobi, *engl.* proliferating cell nuclear antigen

**PD** – eksperimentalna grupa, predijapauzirajuće gusenice

**PHB** – prohibitin

**PPI** – peptidil-prolil cis-trans izomeraze

**PTTH** – protorakotropni hormon

## Q

**Q-PCR** – kvantitativni PCR, *engl.* quantitative polymerase chain reaction



## R

**REST** – program za računanje relativne ekspresije gena, *engl.*

Relative Expression Software Tool

**RGH** – proteini aktivatori ćelijske smrti, *engl.* Reaper, Grim and Hid

**RNS** – reaktivne vrste azota, *engl.* reactive nitrogen species

**ROS** – reaktivne vrste kiseonika, *engl.* reactive oxygen species

**Rpr** – protein koji stimulira apoptozu kod *D. melanogaster*, *engl.* reaper

## S

**SERCA** – jonska pumpa za kalcijum na membrani ER, *engl.*

sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>++</sup>-ATPase

**sHsp** – proteini toplotnog stresa male molekulske mase, *engl.* small heat shock proteins

**Smac/DIABLO** – proapoptotski protein, *engl.* second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI

**SOD** – superoksid-dismutaza

**Strica/Dream** – izvršna kaspaza vinske mušice

## T

**TF** – protein transferin

**TNF** - faktor nekroze tumora, *engl.* tumor necrosis factor

**TORC** – proteinski kompleks, *engl.* target of rapamycin

**TR/TrxR** – tioredoksin reduktaza

**TRAIL** - ligand za receptore smrti, *engl.* TNF-related apoptosis-inducing ligand

**Trx** – tioredoksin, *engl.* thioredoxin

**TW** – ukupna voda, *engl.* total water

## U

**UDP** – uridin-difosfat

**UMP** – uridin-monofosfat

**UPR** – odgovor na nesavijene proteine, *engl.* unfolded protein response

**USP** – protein koji čini deo receptora za ekdizon, *engl.* ultraspiracle

**UTRs** – netranslirajući regioni iRNK, *engl.* untranslated regions

## V

**VDAC** – voltažno-zavisni anjonski kanal, *engl.* voltage-dependent anion channel

## Spisak ilustracija

<b>Slika 1.</b> Vrste mirovanja prema stepenu metaboličke aktivnosti .....	3
<b>Slika 2.</b> Šematski prikaz ekofizioloških faza dijapauze .....	7
<b>Slika 3.</b> Šematski prikaz osnovnih biohemijskih mehanizama dve strategije otpornosti na niske temperature kod insekata.....	12
<b>Slika 4.</b> Mitohondrije – elektron-transportni lanac i sinteza ATP-a.....	20
<b>Slika 5.</b> Raznovrsnost uloga metalotioneina u ćeliji.....	37
<b>Slika 6.</b> Tipovi ćelijske smrti.....	41
<b>Slika 7.</b> Unutrašnji i spoljašnji put otpočinjanja apoptoze.....	44
<b>Slika 8.</b> Uspostavljanje apoptozoma.....	46
<b>Slika 9.</b> Uporedni prikaz apoptotskih puteva u ćelijama <i>Caenorhabditis elegans</i> , <i>Drosophila melanogaster</i> i sisara. ....	53
<b>Slika 10.</b> Nedostatak hranljivih materija izaziva ili aktivaciju mehanizama za preživljavanje ili ćelijsku smrt.....	56
<b>Slika 11.</b> Koraci na kojima dostupnost energije ili koncentracija $Ca^{2+}$ mogu uticati na programiranu ćelijsku smrt.....	60
<b>Slika 12.</b> Rasprostranjenost evropskog kukuruznog i plamenca <i>O. nubilalis</i> .....	64
<b>Slika 13.</b> Životni ciklus kukuruznog plamenca.....	65
<b>Slika 14.</b> Kukuruzni plamenac <i>Ostrinia nubilalis</i> : (a) lutka i (b) adulti.....	66
<b>Slika 15.</b> Kukuruzni plamenac <i>O. nubilalis</i> : (a) izleganje gusenica iz jaja, (b) gusenice starosti jedan dan i (c) gusenice svih pet stupnja. ....	67
<b>Slika 16.</b> Šematski prikaz postavke eksperimenta .....	74
<b>Slika 17.</b> Šematizovan princip rada diferencijalnog skenirajućeg kalorimetra.....	79
<b>Slika 18.</b> Termalna kriva destilovane vode. ....	81

<b>Slika 19.</b> Epidermis sa kutikulom dijapauzirajućih larvi <i>O. nubilalis</i> obojen fluorescentnom DAPI bojom, snimljen pod uvećanjem od 40 puta.....	147
<b>Slika 20.</b> Svilene žlezde dijapauzirajućih larvi <i>O. nubilalis</i> obojene fluorescentnom DAPI bojom, snimljene pod uvećanjem od 40 puta.....	148
<b>Slika 21.</b> Adipociti iz masnog tela dijapauzirajućih larvi <i>O. nubilalis</i> obojeni fluorescentnom DAPI bojom, snimljeni pod uvećanjem od 40 puta.....	149
<b>Slika 22.</b> Elektroforeza ukupne DNK izolovane iz lutki i larvi, tretirana i netretirana ultrazvukom i restrikcionim enzimima .....	150
<b>Slika 23.</b> Termalne krive hemolimfe nedijapauzirajućih (a) i dijapauzirajućih (b) larvi <i>O. nubilalis</i> .....	241
<b>Grafik 1.</b> Sadržaj ukupne vode u celom telu larvi <i>O. nubilalis</i> .....	104
<b>Grafik 2.</b> Sadržaj ukupne, osmotski aktivne i osmotski neaktivne vode u hemolimfi larvi <i>O. nubilalis</i> .....	106
<b>Grafik 3.</b> Sadržaj ukupne, osmotski aktivne i osmotski neaktivne vode u srednjem crevu larvi <i>O. nubilalis</i> .....	108
<b>Grafik 4.</b> Sadržaj ukupne, osmotski aktivne i osmotski neaktivne vode u svilenim žlezdama larvi <i>O. nubilalis</i> .....	110
<b>Grafik 5.</b> Sadržaj ukupne, osmotski aktivne i osmotski neaktivne vode u epidermisu sa kutikulom iz larvi <i>O. nubilalis</i> .....	111
<b>Grafik 6.</b> Sadržaj ukupne, osmotski aktivne i osmotski neaktivne vode u masnom telu larvi <i>O. nubilalis</i> .....	113
<b>Grafik 7.</b> Odnos osmotski aktivne i neaktivne vode u tkivima larvi <i>O. nubilalis</i> ..	114
<b>Grafik 8.</b> Uporedni prikaz osmolalnosti hemolimfe i tačke superhlađenja tokom dijapauze larvi <i>O. nubilalis</i> .....	116
<b>Grafik 9.</b> Uporedni prikaz tačke superhlađenja različitih tkiva tokom dijapauze larvi <i>O. nubilalis</i> .....	118

<b>Grafik 10.</b> Zavisnost količine OA i OI vode u hemolimfi od količine dodatog glicerola .....	120
<b>Grafik 11.</b> Sadržaj adenin nukleotida i energetski naboj u larvama <i>O. nubilalis</i> ..	121
<b>Grafik 12.</b> Odnos količine adenozin-fosfata u larvama <i>O. nubilalis</i> .....	123
<b>Grafik 13.</b> Sadržaj NAD <sup>+</sup> i NADP <sup>+</sup> koenzima u larvama <i>O. nubilalis</i> .....	125
<b>Grafik 14.</b> Sadržaj UMP i GMP nukleotida u larvama <i>O. nubilalis</i> . ....	127
<b>Grafik 15.</b> Specifična aktivnost citohrom <i>c</i> oksidaze u mitohondrijskoj frakciji celog tela larvi <i>O. nubilalis</i> .....	129
<b>Grafik 16.</b> Ct vrednosti referentnih gena – <i>aktina</i> i <i>rps03</i> .....	131
<b>Grafik 17.</b> Relativna ekspresija gena pojedinih kompleksa elektron- -transportnog lanca i ATP sintaze.....	132
<b>Grafik 18.</b> Relativna ekspresija gena za ADP/ATP translokazu i prohibitin 2 .....	134
<b>Grafik 19.</b> Relativna ekspresija gena proteina toplotnog stresa ( <i>Hsp</i> ).....	136
<b>Grafik 20.</b> Relativna ekspresija gena za glutation <i>S</i> -transferazu .....	138
<b>Grafik 21.</b> Relativna ekspresija gena za tioredoksin i glutaredoksin .....	140
<b>Grafik 22.</b> Relativna ekspresija gena za metalotionein i feritin .....	142
<b>Grafik 23.</b> Relativna ekspresija gena za faktor nekroze tumora ( <i>TNF</i> ).....	144
<b>Grafik 24.</b> Relativna ekspresija gena inhibitora Bax proteina .....	146
<b>Grafik 25.</b> Kaspazi 9 slična specifična aktivnost u homogenatu lutki (L), larvi (ND, D2t i D) i u larvalnim tkivima (masno telo i epidermis sa kutikulom) .....	151
<b>Grafik 26.</b> Kaspazi 8 slična specifična aktivnost u homogenatu lutki (L), larvi (ND, D2t i D) i u larvalnim tkivima (masno telo i epidermis sa kutikulom) .....	153
<b>Grafik 27.</b> Kaspazi 3 slična specifična aktivnost u homogenatu lutki (L), larvi (ND, D2t i D) i u larvalnim tkivima (masno telo i epidermis sa kutikulom) .....	155

## Spisak tabela

<b>Tabela 1.</b> Sadržaj telesne vode (%) pojedinih vrsta insekata iz različitih redova ..15	15
<b>Tabela 2.</b> Pregled reaktivnih vrsta kiseonika i azota.....30	30
<b>Tabela 3.</b> Sistematska klasifikacija kukuruznog plamenca <i>O. nubilalis</i> .....63	63
<b>Tabela 4.</b> Sastojci jednog kilograma hranljive podloge za gajenje larvi.....73	73
<b>Tabela 5.</b> Pregled svih eksperimentalnih grupa korišćenih u analizama.....76	76
<b>Tabela 6.</b> Sadržaj ukupne vode u celom telu larvi <i>O. nubilalis</i> ..... 105	105
<b>Tabela 7.</b> Sadržaj ukupne (a), sadržaj osmotski aktivne (b) i sadržaj osmotski neaktivne vode (c) u hemolimfi larvi <i>O. nubilalis</i> ..... 107	107
<b>Tabela 8.</b> Sadržaj ukupne (a), sadržaj osmotski aktivne (b) i sadržaj osmotski neaktivne vode (c) u srednjem crevu larvi <i>O. nubilalis</i> ..... 109	109
<b>Tabela 9.</b> Sadržaj ukupne (a), sadržaj osmotski aktivne (b) i sadržaj osmotski neaktivne vode (c) u epidermisu sa kutikulom iz larvi <i>O. nubilalis</i> ..... 112	112
<b>Tabela 10.</b> Dvofaktorska analiza varijanse (ANOVA) odnosa OA i OI vode u različitim stadijumima (faktor S) i tkivima (faktor T) larvi <i>O. nubilalis</i> ..... 115	115
<b>Tabela 11.</b> Osmolalnost (a) i tačka superhlađenja (b) hemolimfe larvi <i>O. nubilalis</i> ..... 117	117
<b>Tabela 12.</b> Dvofaktorska analiza varijanse (ANOVA) odnosa tačke superhlađenja (SCP) različitih tkiva (faktor T) i različitih stadijuma (faktor S) larvi <i>O. nubilalis</i> ..... 119	119
<b>Tabela 13.</b> Sadržaj adenin nukleotida (a, b, c) i energetski naboj (d)..... 122	122
<b>Tabela 14.</b> Odnos ADP/ATP (a) i AMP/ATP (b) adenin nukleotida u larvama <i>O. nubilalis</i> ..... 124	124
<b>Tabela 15.</b> Sadržaj NAD <sup>+</sup> (a) i NADP <sup>+</sup> (b) u larvama <i>O. nubilalis</i> ..... 126	126
<b>Tabela 16.</b> Sadržaj UMP (a) i GMP (b) nukleotida u larvama <i>O. nubilalis</i> ..... 128	128

<b>Tabela 17.</b> Specifična aktivnost citohrom <i>c</i> oksidaze u mitohondrijskoj frakciji celih larvi <i>O. nubilalis</i> .....	130
<b>Tabela 18.</b> Relativna ekspresija gena elektron-transportnog lanca (a, b, c) i ATP sintaze (d) u masnom telu larvi <i>O. nubilalis</i> .....	133
<b>Tabela 19.</b> Relativna ekspresija gena za ADP/ATP translokazu (a) i prohibitin 2 (b) u masnom telu larvi <i>O. nubilalis</i> .....	135
<b>Tabela 20.</b> Relativna ekspresija <i>Hsp90</i> (a), <i>Hsc70</i> (b), <i>Hsp20.4</i> (c) i <i>Hsp20.1</i> (d) u masnom telu larvi <i>O. nubilalis</i> .....	137
<b>Tabela 21.</b> Relativna ekspresija gena za glutation <i>S</i> -transferazu u masnom telu larvi <i>O. nubilalis</i> .....	139
<b>Tabela 22.</b> Relativna ekspresija gena za tioredoksin (a) i glutaredoksin (b) u masnom telu larvi <i>O. nubilalis</i> .....	141
<b>Tabela 23.</b> Relativna ekspresija gena za metalotionein (a) i feritin (b) u masnom telu larvi <i>O. nubilalis</i> .....	143
<b>Tabela 24.</b> Relativna ekspresija gena faktora nekroze tumora ( <i>TNF</i> ) masnom telu larvi <i>O. nubilalis</i> .....	145
<b>Tabela 25.</b> Dvofaktorska analiza varijanse (ANOVA) aktivnosti kaspazi 9 sličnih enzima u različitim tkivima (faktor T) i životnim stadijumima (faktor S) kukuruznog plamenca, <i>O. nubilalis</i> .....	152
<b>Tabela 26.</b> Dvofaktorska analiza varijanse (ANOVA) aktivnosti kaspazi 8 sličnih enzima u različitim tkivima (faktor T) i životnim stadijumima (faktor S) kukuruznog plamenca, <i>O. nubilalis</i> .....	154
<b>Tabela 27.</b> Dvofaktorska analiza varijanse (ANOVA) aktivnosti kaspazi 3 sličnih enzima u različitim tkivima (faktor T) i životnim stadijumima (faktor S) kukuruznog plamenca, <i>O. nubilalis</i> .....	156
<b>Tabela 28.</b> Relativna aktivnost kaspazama sličnih enzima u homogenatu celih larvi i tkivima (masno telo i epidermis sa kutikulom) u odnosu na aktivnost u homogenatu lutki <i>O. nubilalis</i> (100%).....	157

<b>Tabela 29.</b> Dvofaktorska analiza varijanse (ANOVA) relativne aktivnosti kaspaza u različitim stadijumima (faktor 1) i tkivima (faktor 2) <i>O. nubilalis</i> .....	158
<b>Tabela 30.</b> Parovi početnica korišćenih u Q-PCR analizi ekspresije gena.....	238
<b>Tabela 31.</b> Rezultati sa diferencijalne skenirajuće kalorimetrije i osmometra. ...	240
<b>Tabela 32.</b> Sadržaj adenin nukleotida i energetski naboj u celom telu larvi <i>O. nubilalis</i> .....	242
<b>Tabela 33.</b> Sadržaj pojedinih koenzima i nukleotida u celom telu larvi <i>O. nubilalis</i> .....	242
<b>Tabela 34.</b> Specifična aktivnost COX u mitohondrijskoj frakciji celog tela larvi <i>O. nubilalis</i> .....	242
<b>Tabela 35.</b> Relativna ekspresija gena u masnom telu larvi <i>O. nubilalis</i> .....	243
<b>Tabela 36.</b> Specifična aktivnost kaspazama sličnih enzima u homogenatu lutki, larvi i larvalnim tkivima <i>O. nubilalis</i> .....	244

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1 Mirovanje kao strategija preživljavanja .....	2
1.2 Dijapauza .....	4
1.2.1 Različite vrste dijapauze i njihova hormonska regulacija .....	8
1.2.2 Dijapauza i otpornost na niske temperature .....	12
1.3 Metaboličke promene u dijapauzi.....	14
1.3.1 Sadržaj i promet vode .....	14
1.3.2 Akumulacija energetske rezerve .....	18
1.3.3 Supresija metabolizma.....	19
1.4 Odgovor na stres u dijapauzi .....	25
1.4.1 Ekspresija gena i sinteza proteina .....	25
1.4.2 Antioksidativna zaštita.....	30
1.5 Regulacija ćelijske smrti u uslovima hipometabolizma .....	41
1.5.1 Mehanizmi apoptoze.....	43
1.5.2 Kaspaze – izvršni proteini apoptoze.....	49
1.5.3 Evolutivna očuvanost osnovnih mehanizama apoptoze.....	53
1.5.4 Regulacija ćelijske smrti tokom gladovanja i produženog hipometabolizma.....	55
1.6 Značaj proučavanja dijapauze .....	62
1.7 Kukuruzni plamenac ( <i>Ostrinia nubilalis</i> , Hbn.).....	63
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>69</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>71</b>
3.1 Sakupljanje biološkog materijala i gajenje u laboratorijskim uslovima .....	72
3.2 Postavka eksperimenta.....	74
3.3 Priprema uzoraka.....	77
3.4 Laboratorijske analize.....	78
3.4.1 Gravimetrijsko određivanje sadržaja ukupne vode .....	78
3.4.2 Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija.....	79
3.4.3 Određivanje osmolalnosti hemolimfe .....	82



3.4.4	Analiza sadržaja pojedinih nukleotida i koenzima metodom kapilarne elektroforeze (CE).....	83
3.4.5	Određivanje aktivnosti citohrom c oksidaze u mitohondrijama.....	86
3.4.6	Ekspresija gena .....	88
3.4.7	Fluorescentna mikroskopija .....	95
3.4.8	Određivanje fragmentisanosti genomske DNK.....	96
3.4.9	Određivanje aktivnosti kaspaza.....	98
3.5	Statistička obrada podataka.....	102
<b>4.</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>103</b>
4.1	Sadržaj ukupne vode.....	104
4.2	Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija i osmometrija .....	106
4.2.1	Sadržaj ukupne, osmotski aktivne i neaktivne vode u odabranim tkivima gusenica .....	106
4.2.2	Odnos osmotski aktivne i neaktivne vode .....	114
4.2.3	Osmolalnost i tačka superhlađenja.....	116
4.2.4	Uticaj glicerola na sadržaj OA i OI vode u hemolimfi u <i>in vitro</i> uslovima.....	120
4.3	Sadržaj pojedinih nukleotida i koenzima.....	121
4.3.1	ATP, ADP, AMP i energetske naboj .....	121
4.3.2	Odnos koncentracije adenozin-fosfata.....	123
4.3.3	NAD <sup>+</sup> i NADP <sup>+</sup> .....	125
4.3.4	UMP i GMP.....	127
4.4	Aktivnost citohrom c oksidaze (COX).....	129
4.5	Relativna ekspresija odabranih gena .....	131
4.5.1	Ct vrednosti referentnih gena.....	131
4.5.2	Geni elektron-transportnog lanca i ATP sintaze .....	132
4.5.3	Geni za ADP/ATP translokazu i prohibitin 2 .....	134
4.5.4	Geni proteina toplotnog stresa .....	136
4.5.5	Gen za glutation S-transferazu .....	138
4.5.6	Geni za tioredoksin i glutaredoksin .....	140
4.5.7	Geni za metalotionein i feritin .....	142
4.5.8	Gen za faktor nekroze tumora ( <i>TNF</i> ).....	144

4.5.9	Gen za inhibitor Bax proteina.....	146
4.6	Fluorescentna mikroskopija.....	147
4.7	Esej fragmentisanosti DNK.....	150
4.8	Aktivnost kaspaza.....	151
4.8.1	Aktivnost kaspazi 9 sličnih enzima.....	151
4.8.2	Aktivnost kaspazi 8 sličnih enzima.....	153
4.8.3	Aktivnost kaspazi 3 sličnih enzima.....	155
4.8.4	Relativna aktivnost kaspaza.....	157
<b>5.</b>	<b>DISKUSIJA.....</b>	<b>159</b>
5.1	Metaboličke promene tokom dijapauze.....	160
5.1.1	Sadržaj ukupne telesne vode u dijapauzi.....	160
5.1.2	Osmolalnost hemolimfe, promet vode i tačke superhlađenja tkiva.....	162
5.1.3	Adenin nukleotidi i energetski naboj.....	167
5.1.4	Nikotin-adenin dinukleotidi (NAD <sup>+</sup> i NADP <sup>+</sup> ).....	170
5.1.5	Aktivnost citohrom <i>c</i> oksidaze.....	171
5.1.6	Ekspresija gena kompleksa elektron-transportnog lanca i ATP sintaze.....	172
5.1.7	Ekspresija gena za ATP/ADP translokazu i prohibitin 2.....	175
5.1.8	UPM i GMP.....	178
5.2	Relativna ekspresija gena u vezi sa odgovorom na stres.....	180
5.2.1	Ekspresija gena antioksidativne zaštite.....	180
5.2.2	Ekspresija gena proteina toplotnog stresa.....	187
5.3	Ćelijska smrt i dijapauza.....	192
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI.....</b>	<b>197</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>203</b>
<b>8.</b>	<b>PRILOZI.....</b>	<b>237</b>
	<b>BIOGRAFIJA AUTORA.....</b>	<b>245</b>

# **1. UVOD**

Insekti predstavljaju najbrojniju klasu životinja sa preko milion opisanih vrsta do sada, a procenjuje se da ih ima nekoliko puta više (Krunić, 1995). Oni su stara grupa organizama čiji su fosilni ostaci nađeni u gornjim slojevima Karbona, pre više od 70 miliona godina (Matoničkin i saradnici, 1999), a postoje podaci da su i mnogo stariji organizmi (Smith i Kennedy, 2009).

Ovu klasu zglavkara karakteriše izuzetna raznolikost građe, fiziologije, ponašanja i načina života. Relativno mali broj vrsta insekata prilagođen je životu u vodi (Krunić, 1995), dok je najviše vrsta prilagođeno suvozemnom načinu života. Insekti naseljavaju staništa od tropa do polova, među kojima i neka od najnepristupačnijih.

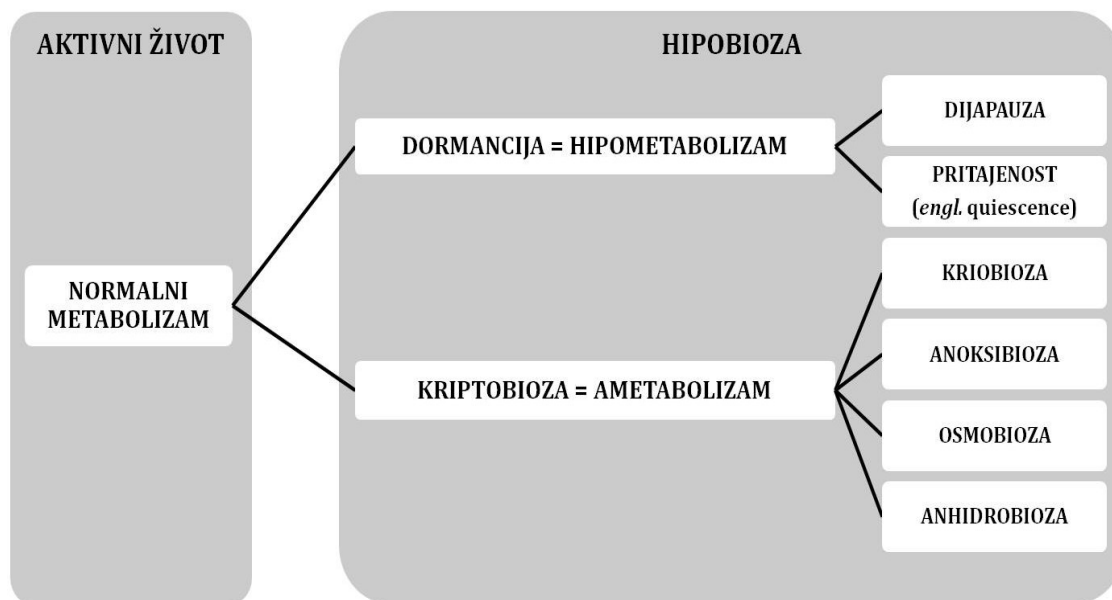
Tokom svog dugog evolutivog razvoja insekti su stekli brojne adaptacije na nepovoljne uslove staništa. Manji broj vrsta odlazi sa nepovoljnih na povoljnija mesta za život (migrira), dok većina mora da se suoči sa teškim uslovima na staništu kao što su niske i visoke temperature, ograničeni izvori hrane, visoke koncentracije soli, hipoksija i anoksija, nedostupna ili slabo dostupna voda.

## **1.1 Mirovanje kao strategija preživljavanja**

Jedan od načina za preživljavanje nepovoljnih uslova na staništu je ulazak u fazu mirovanja (dormanciju). Još davne 1702. godine Anton van Levenhuk je u suvom talogu sa krovova kuća pod mikroskopom uočio postojanje „neaktivnih animakula“ (različite vrste filuma Tardigrada i Rotifera) i primetio da one postaju aktivne vrlo brzo nakon kontakta sa vodom. Ovaj fenomen kod različitih životinja detektovali su i drugi naučnici i nazvali ga kriptobiozom, latentnim ili skrivenim životom (Watanabe, 2006).

**Kriptobioza** se definiše kao stanje organizma u kome su životni procesi svedeni na najniži nivo, a tokom kojeg organizmi stiču otpornost na ekstremne uslove toplote, hladnoće, suše, UV zračenja i slično (Denlinger, 2009). Organizmi koje ulaze u kriptobiozu sposobni su da, nakon povratka povoljnih uslova u životnoj sredini, izađu iz ovog hipometaboličkog stanja i povrate sve životne funkcije u kratkom vremenskom periodu (Watanabe, 2006).

Na osnovu nivoa metaboličke depresije Keilin je 1959. godine vrste mirovanja podelio na hipometaboličke i ametaboličke (Slika 1).



**Slika 1.** Vrste mirovanja prema stepenu metaboličke aktivnosti (Keilin, 1959).

**Dijapauza i pritajenost** (ili mirovanje u užem smislu, poznatije kao estivacija i zimska ukočenost) prema Keilinovoj klasifikaciji pripadaju hipometaboličkim stanjima u kojima nivo metaboličke aktivnosti pada na niži nivo od normalnog metabolizma, ali ne i na teško detektujuće nivoe, kakvi se javljaju kod ametabolizma. Organizmi mogu ući u dijapauzu čak i kada su spoljašnji uslovi za život pogodni, jer je ulazak u ovo hipometaboličko stanje često uslovljen nestresnim faktorima, za razliku od kriptobioza koje su indukovane stresnim uslovima života (Danks, 1987; Denlinger, 2009).

## 1.2 Dijapauza

Termin *dijapauza* je skovao 1893. američki entomolog Vilijam Morton Viler (*engl.* William Morton Wheeler). On je primetio da se embrioni rotiraju tokom razvoja u jajima nisekata – prvo u smeru kazaljke na satu, a potom u suprotnom. Period zastoja (statičnost) tokom promene smera rotacije nazvao je *dijapauza*. Francuski entomolog Enegi (*fr.* Hennéguy) je 1904. upotrebu termina *dijapauza* proširio na bilo koji period tokom koga dolazi do zaustavljanja razvoja insekata (Philogène, 2008).

Dijapauza se definiše kao period zaustavljenog razvoja koji se javlja na određenom razvojnom stadijumu, karakterističnom za svaku vrstu. Dijapauza kod insekata može nastupiti na stadijumu embriona (jajeta), larve, lutke ili odrasle jedinke. Organizam može da uđe u fazu dijapauze čak i u najpovoljnijim uslovima za život, jer ulazak u ovo stanje može biti genetski kontrolisan, kao i uslovljen pojavom nestresnih faktora kao što su fotoperiod ili prisustvo biljnih hormona i slično (Denlinger, 1985; Denlinger, 2002; Košťál, 2006; Nation, 2008).

Dijapauzu, kao specifičan deo ontogenetskog razvoja insekata, karakteriše supresija metabolizma i prestanak ili usporavanje razvića, ekspresija određenih gena, kao i povećanje otpornosti na stresne faktore sredine, uključujući pojačanu otpornost na niske temperature (Rinehart i dr., 2000). Sposobnost insekata da prežive dugotrajne nepovoljne periode u stanju dijapauze omogućava im da koriste sezonski uslovljene resurse i da se adaptiraju i kolonizuju umerene, tropske i polarne klimatske regione (Denlinger, 2008). Takođe, različitim trajanjem dijapauze između generacija jedne populacije omogućava se ukrštanje genotipova koji su vremenski razdvojeni i koji se zbog toga ne bi mogli ukrstiti (MacRae, 2010).

Shvatanje dijapauze kao kompleksnog procesa ili perioda usporenog razvoja, a ne statičnog stanja organizma, široko je prihvaćeno u naučnim krugovima koji se bave ne samo dijapauzom insekata, već i drugih beskičmenjaka kod kojih se ona javlja: nematoda, rakova, rotatorija, kopnenih puževa i drugih organizama (Košťál, 2006).

U zavisnosti od toga da li dijapauza predstavlja obavezni deo ontogenetskog razvoja organizma, postoje tri tipa dijapauze: безусловna (obavezna, obligatorna), uslovljena (izborna, fakultativna) i mešovita.

Bezuslovna dijapauza je ređi tip dijapauze, jer predstavlja deo ontogenetskog programa insekata koji je uslovljen unutrašnjim biološkim satom, strogo je genetički kontrolisan i nezavisan od promena u spoljašnjoj sredini (Denlinger, 2002; Košťál, 2006).

Sa druge strane, uslovna dijapauza je šire rasprostranjena i započinje signalima iz spoljašnje sredine koji nagoveštavaju pogoršanje uslova na staništu. Inicijatori dijapauze su specifični za svaku vrstu, a najčešće podrazumevaju promenu odnosa dužine dana i noći (fotoperiod), snižavanje prosečne temperature, smanjenje dostupnosti i raznovrsnosti hrane, snižen nivo kiseonika, prisustvo sekundarnih metabolita i hormona u hrani i slično (Hahn i Denlinger, 2007; Denlinger, 2009). Iako je skraćenje fotoperioda najčešći inicijator dijapauze (Nylin, 2013), na otpočinjanje dijapauze i njen intenzitet utiču i drugi faktori (Košťál, 2006; Denlinger, 2009).

Mešoviti tip dijapauze je onaj kod koga deo populacije безусловno ulazio u dijapauzu, dok drugi deo ne ulazi, podležući uslovnoj dijapauzi, kao što je slučaj kod odraslih jedinki krompirove zlatice *Leptinotarsa decemlineata* (detaljnije u delu 1.2.1.4: *Reproduktivna (adultna) dijapauza*).

Dijapauza insekata je kompleksan, dinamičan period koji se sastoji od nekoliko postupnih faza tokom kojih se organizam postepeno menja. Kako je razvoj dijapauze karakteristika svake vrste, populacije ili pak jedinke, i zasniva se na fiziološkim procesima koji su umnogome uslovljeni različitim faktorima određenog biotopa, može se reći da je priroda dijapauze *eko-fiziološka* (Košťál, 2006).

Iako se razvojni stadijum tokom kojeg insekti ulaze u fazu mirovanja razlikuje između vrsta, postoje određene zajedničke promene koje nastupaju tokom mirovanja, kao što su promene:

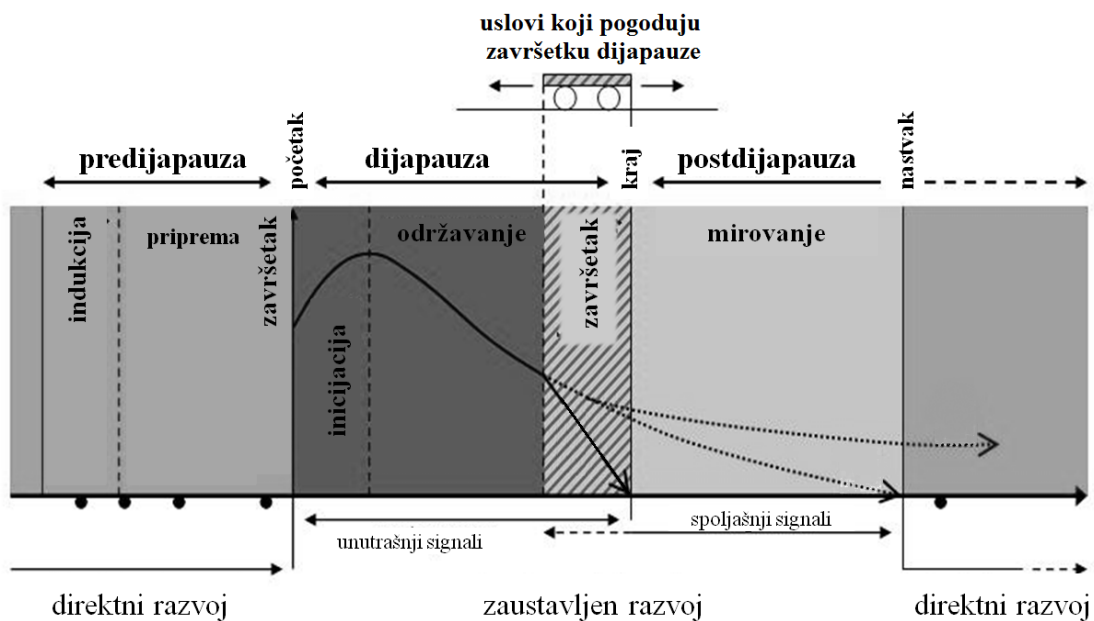
- u ponašanju – prestanak hranjenja, povlačenje na mirno mesto, slabije kretanje ili potpuna nepokretnost, grupisanje jedinki (*engl.* crowding);
- u morfologiji – promene u sastavu kutikule, kokona, lučenje karakteristične zaštitne sluzi i drugih omotača (Nation, 2008);
- u fiziologiji – prestanak varenja, poslednja defekacija radi izbacivanja bakterija i potencijalnih nukleatora kristalizacije, supresija manje važnih fizioloških procesa i smanjenje intenziteta disanja (Denlinger, 2002; Storey i Storey, 2004; Hahn i Denlinger, 2007);
- na biohemijskom nivou – sniženje opšte stope metabolizma, smanjenje aktivnosti ili ukidanje manje potrebnih metaboličkih puteva i usmeravanje metabolizma ka sintezi karakterističnih zaštitnih molekula (Storey i Storey, 2004; Hahn i Denlinger, 2007), i
- na molekularnom nivou – ekspresija karakterističnih grupa gena koji učestvuju u zaštiti od stresa, regulaciji ćelijskog ciklusa i ćelijske smrti (MacRae, 2010).

Najdublju metaboličku depresiju pokazuju organizmi kod kojih se dijapauza javlja u stadijumu koji karakteriše slaba pokretljivost – embrioni, lutke, ali i zrele larve. Sa druge strane, postoje insekti čije dijapauzirajuće larve i odrasle jedinke pokazuju manju supresiju metabolizma, pa čak i ekstremni slučajevi kao npr. dijapauzirajuće larve dvokrilca *Chironomus riparius* koje mogu da se hrane i rastu tokom dijapauze (Godeeris, i dr., 2001).

Literatura o dijapauzi obiluje različitim terminima i podelama na različite faze, međutim, danas najveći broj entomologa prihvata podelu koju je predložio Košťál (2006), a prema kojoj *dijapauzu u širem smislu* možemo podeliti na tri glavne faze (Slika 2): *predijapauzu* (indukcija i priprema), *dijapauzu* (inicijacija, održavanje i terminacija) i *postdijapauzu* (mirovanje).



Svaka faza dijapauze obuhvata nekoliko potfaza koje zavise, kako od genotipski zavisnih fizioloških promena, tako i od uslova spoljašnje sredine (Slika 2). Zbog toga, izraz ekofiziološka faza ukazuje na to da je napredak kroz faze dijapauze regulisan interakcijom endogenih i egzogenih faktora (Košťál, 2006).



**Slika 2.** Šematski prikaz ekofizioloških faza dijapauze. Prerađeno prema Košťál, 2006.

Dužina perioda mirovanja kod insekata je varijabilna i u umerenom klimatskom području dijapauza obično traje od 7 do 10 meseci. Zbog dugog vremenskog perioda gladovanja, insekti su tokom dijapauze energetske zavisni od rezervi stvorenih pre mirovanja, u pripremnim fazama. Iz tog razloga, smatra se da je dijapauza „skupa“ životna strategija i da se „cena“ koju organizam „plaća“ obično ogleda u stepenu preživljavanja i padu plodnosti nakon izlaska iz dijapauze (Matsuo, 2006).

## 1.2.1 Različite vrste dijapauze i njihova hormonska regulacija

Dijapauza je kompleksan biološki fenomen koji obuhvata ekološke, evolutivne i molekularne procese međusobno povezane fiziološkim i neurobiološkim mehanizmima (Nylin, 2013). Hormonska regulacija dijapauze se razlikuje između vrsta u zavisnosti od ontogenetskog stadijuma u kojem organizmi miruju (Denlinger, 1985; Denlinger, 2002). Iako insekti mogu ulaziti u dijapauzu u različitim razvojnim fazama – fazi embriona, larve, lutke ili odrasle jedinke, pojedinačna vrsta miruje uvek tokom istog razvojnog stadijuma (Nation, 2008).

### 1.2.1.1 Dijapauza u stadijumu jajeta ili embriona

Dijapauza u stadijumu jajeta ili embriona je karakteristična za mnoge vrste umerenih klimatskih područja. Najbolje je proučena kod svilene bube *Bombyx mori* kod koje je fakultativna, sem kod onih populacija koje imaju samo jednu generaciju tokom godine, kod kojih je uočeno da je obligatorna. Ženke svilene bube koje rastu u rano proleće, u uslovima kratkog dana, polažu nedijapauzirajuća jaja iz kojih se izležu larve, a tokom leta razvijaju adulti. Ženke koje rastu tokom leta u uslovima dugog dana proizvode u subezofagijskim žlezdama hormon dijapauze, koji putem hemolimfe dospeva do jaja i indukuje njihov ulazak u dijapauzu dva dana nakon polaganja. Hormon dijapauze je neuropeptid koji se sastoji od 25 amino-kiselina (Yamashita, 1996), a embrionska dijapauza kod svilene bube je dobar model za proučavanje mirovanja koje nastaje u ranim fazama embriogeneze.

Ipak, postoje vrste kod kojih dijapauza nastupa u kasnim fazama embriogeneze, npr. kod skakavca *Melanoplus sanguinipes* kod koga embrioni ulaze u dijapauzu razvijeni oko 90%. Osim toga, kod ove vrste u zavisnosti od geografske širine dijapauza može biti ili fakultativna (umerena područja S. Amerike) ili obligatorna (Aljaska, podarctička oblast) i može nastupiti u različitim stadijumima embrionalnog razvoja (Fielding, 2006). Regulacija dijapauze u kasnijim fazama embriogeneze se verovatno razlikuje od one koja je opisana kod svilene bube, ali je još uvek nedovoljno proučena.

### **1.2.1.2 Dijapauza u stadijumu larve**

Dijapauza u stadijumu larve je najčešća među vrstama iz redova Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera, Coleoptera, Neuroptera, Odonata, Orthoptera, Homoptera, Hemiptera i Plecoptera (Nation, 2008). Može nastupiti u bilo kom stupnju, karakterističnom za svaku vrstu, a najčešće se javlja u posljednjem. Iako je retko, larve nekih vrsta su pokretne tokom dijapauze i hrane se, a neke se čak i presvlače bez uvećanja telesne mase tj. rasta tzv. „presvlačenje u mestu“ (Nation, 2008).

Iako intenzitet dijapauze može biti različit među larvama različitih vrsta, hormonska regulacija je vrlo slična i ogleda se u visokim koncentracijama juvenilnog hormona (JH) pre ulaska u dijapauzu. Nakon inicijacije dijapauze, kod nekih vrsta, koncentracija JH opada i nije neophodna za održavanje mirovanja tokom perioda kratkog dana. Takođe, protorakalne žlezde koje proizvode ekdizon su ili slabo aktivne ili ne uspevaju da sintetišu dovoljno ekdizona koji bi mogao da poništi efekte JH (Chippendale, 1977). Tako je utvrđeno da je koncentracija ekdizona tokom cele larvalne dijapauze *O. nubilalis* niža od najniže izmerene koncentracije nedijapauzirajućih gusenica. Takođe, utvrđeno je da je potrebno da prođe najmanje 10 do 14 dana od izlaganja dijapauzirajućih larvi fotoperiodu dugog dana, kako bi koncentracija ekdizona počela da raste i bila dovoljna da dovede do ulutkavanja gusenica (Bean i Beck, 1983). Smatra se da je glavni razlog ulaska jedinke u larvalnu i pupalnu dijapauzu nemogućnost daljeg razvoja tj. presvlačenja i rasta (Nylin, 2013).

### **1.2.1.3 Dijapauza u stadijumu lutke**

Dijapauza u stadijumu lutke je česta strategija za preživljavanje zime. Dobro je proučena kod nekoliko vrsta kao što su *Sarcophaga crassipalpis*, *Sarcophaga bullata* i *Hyalophora cercopia*. Pedesetih godina prošlog veka je Karol Vilijams kod lutki *H. cercopia* utvrdio važnost protorakotropnog hormona (PTTH) u regulaciji sinteze ekdizona u protorakalnim žlezdama. Takođe, eksperimentalno je pokazao da se tokom dijapauze PTTH ne sintetiše u neuroendokrinim ćelijama

mozga sve dok lutke ne provedu određen period na niskim temperaturama. Na ovaj način je pokazano da je izlaganje niskim temperaturama kod ove vrste neophodno za završetak dijapauze (Williams, 1952).

Za vrstu *S. crassipalpis* svojstvena je fakultativna dijapauza u koju ulaze lutke pod uticajem fotoperioda kratkog dana (manje od 12 sati svetla). Dijapauza traje nekoliko meseci, prekida se tokom sredine zime, ali lutke ostaju u fazi posledijapauzalne pritajenosti (*engl.* quiescence) sve do kraja dijapauze. Utvrđeno je da su ćelije u mozgu lutki zaustavljene u G0/G1 fazi ćelijskog ciklusa, a da se nakon namerno izazvanog prekida dijapauze (npr. tretman heksanom) u moždanom tkivu počinje, između ostalih, ekspresovati i gen za PCNA (*engl.* proliferating cell nuclear antigen), koji se smatra glavnim regulatorom ćelijskog ciklusa u dijapauzi (Tammariello i Denlinger, 1998).

Iako se zna da je dijapauza u stadijumu lutki posledica nedovoljne količine ekdizona za završetak razvoja, mehanizmi koji su odgovorni za nedostatak ovog hormona su i dalje nedovoljno proučeni, a pretpostavlja se da se značajno razlikuju među vrstama. Kod nekih vrsta je nizak titar ekdizona posledica nedostatka ili smanjenog nivoa PTTH (Williams, 1952), dok kod drugih vrsta to može biti posledica dejstva JH, regulacije ekspresije receptora za ekdizon, USP proteina (*engl.* ultraspiracle) ili drugih uticaja (Nation, 2008).

#### **1.2.1.4 Reproductivna (adultna) dijapauza**

Dijapauza u adultnom stadijumu karakteristična je za predstavnike insekata iz redova Coleoptera, Lepidoptera, Diptera, Heteroptera, Orthoptera, Neuroptera i Trichoptera (Nation, 2008). Za razliku od larvalne i pupalne dijapauze, adultna dijapauza nije posledica nemogućnosti presvlačenja već predstavlja odlaganje razmnožavanja (Nylin, 2013). Iako se zna da brojni hormoni učestvuju u regulaciji razmnožavanja, smatra se da je za reproduktivnu dijapauzu najviše odgovoran ili nedostatak ili niska koncentracija JH koji se sintetise u žlezdanom sistemu *corpora allata* (Denlinger, 2002).

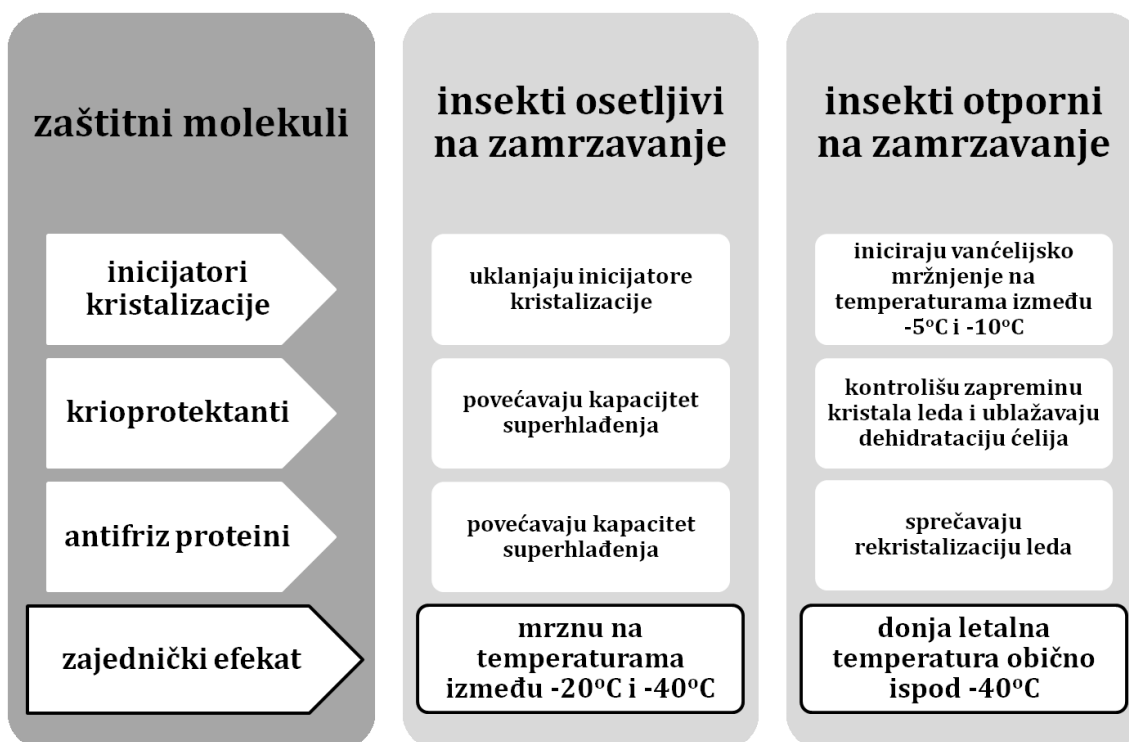
Reproduktivna dijapauza je najviše proučavana kod ekonomski važne vrste – krompirove zlatice *Leptinotarsa decemlineata*. Kod zlatice je utvrđeno da čak 20–30% adultnih jedinki, koje se razvijaju tokom leta i perioda dugog dana, ipak ulazi u dijapauzu (mešoviti tip dijapauze). Dalje, skraćenje dana krajem leta inicira kod odraslih jedinki ulazak u period intenzivnog hranjenja, akumulacije rezervi, histolize mišića krila i migracije u dublje slojeve zemlje. Pojedine jedinke tokom dijapauze se vraćaju na površinu zemlje i hrane se, dok većina ne izlazi iz dijapauze sve do otopljenja i pojave vegetacije tokom proleća. Takođe, utvrđeno je da manji broj jedinki može ostati u dijapauzi i po nekoliko godina, pa čak i do 10 godina (Tauber i Tauber, 2002).

Osim JH i za insulin je utvrđeno u određenom broju studija da ima uticaj na ulazak u dijapauzu. Naime, kada se komarcu *Culex pipiens* inhibira sinteza receptora za insulin dolazi do razvoja stanja sličnog reproduktivnoj dijapauzi, a koje je reverzibilno i može se prekinuti dodatkom JH (Sim i Denlinger, 2008).

## 1.2.2 Dijapauza i otpornost na niske temperature

Dijapauza je neraskidivo povezana sa razvojem otpornosti organizma na stresogene faktore – niske/visoke temperature, dehidraciju, UV zračenje i dr. Insekti umerenih i polarnih područja su u dijapauzi tokom nepovoljnih zimskih meseci i kod njih je najčešće izražena otpornost na niske temperature, ali i otpornost na dehidraciju koja nastaje mržnjenjem tečnosti na temperaturama ispod nule.

Prema otpornosti na niske temperature insekti se grubo mogu podeliti na dve grupe: otporne i neotporne na zamrzavanje telesnih tečnosti (Slika 3). Samo mali broj insekata ima sposobnost preživljavanja zamrzavanja vanćelijskih telesnih tečnosti, dok većina nije za to sposobna i zato poseduje niz adaptacija kojima izbegavaju zamrzavanje.



**Slika 3.** Šematski prikaz osnovnih biohemijskih mehanizama dve strategije otpornosti na niske temperature kod insekata. Prerađeno prema Bale, 2002.

Osnovni biohemijski i molekularni mehanizmi kod obe grupe su slični (Slika 3) i uključuju sintezu krioprotektora kao što su polihidroksilni alkoholi (glicerol, sorbitol i dr.) i ugljeni hidrati (trehaloza, glukoza i dr.) koji koligativno snižavaju tačku superhlađenja, dok nekolicativno stabilizuju proteine i ćelijske membrane.

Neke vrste insekata poseduju sposobnost da sintetišu antifriz proteine (AFP, *engl.* antifreeze proteins), koji nekolicativno snižavaju tačku superhlađenja hemolimfe.

Osim navedenih molekula i mnogi drugi učestvuju u zaštiti organizma od efekata niskih temperatura i dehidracije: slobodne amino-kiseline (prolin, alanin, arginin i dr.), proteini toplotnog stresa (HSPs, *engl.* heat shock proteins), poliamini, feritin, metalotioneini, antioksidativni molekuli i enzimi (Clark i Worland, 2008; Kojić, 2009; MacRae, 2010; Carrasco i dr., 2011; Storey i Storey, 2012). Takođe, smatra se da u dijapauzi u ćelijskom odgovoru na stres važnu ulogu imaju i modifikacije citoskeletnih elemenata, uključujući one koje povećavaju elastičnost ćelijske membrane, čime potpomažu njenu funkcionalnost na niskim temperaturama (Rinehart i dr., 2007).

Jedan vid zaštite organizma od efekata niskih temperatura tokom dijapauze ogleda se i u promenama u sastavu lipida u organizmu – najčešće se povećava udeo nezasićenih masnih kiselina kao što su linoleinska (Khani i dr., 2007), palmitooleinska i oleinska (Vukašinović i dr., 2013).

## 1.3 Metaboličke promene u dijapauzi

### 1.3.1 Sadržaj i promet vode

Ključni faktor koji determiniše opstanak organizama na kopnenim staništima je voda, glavni rastvarač u živim sistemima (Hadley, 1994a). Da bi se shvatili problemi sa kojima se kopneni organizmi suočavaju na svojim staništima, kao i značaj očuvanja vode, dovoljno je uporediti osnovne fizičko-hemijske osobine vazduha i vode.

Gustina vode je oko hiljadu puta veća od gustine vazduha, te organizmima u vodi nije potrebna velika telesna potpora, za razliku od kopna gde im je i za minimalno kretanje neophodna neka forma čvršćeg skeleta. Specifični toplotni kapacitet vode je oko tri hiljade puta veći u odnosu na isti kod vazduha i voda je zato termički stabilnije stanište. U vodi organizmi mnogo sporije gube toplotu, a temperaturna amplituda dnevno-noćnih i sezonskih promena je mnogo manja u odnosu na terestrična staništa. Takođe, i latentna toplota zamrzavanja, tj. količina energije koju sistem treba da oslobodi da bi prešao u čvrsto stanje, kod vode je visoka što opet govori o velikoj stabilnosti glavnog rastvarača u biološkim sistemima (Pottis, 1994; Topisirović, 2001).

Dalje, iako je količina dostupnog kiseonika oko 30 puta veća u vazduhu nego u istoj zapremini vode, njegovo usvajanje i istovremeno otpuštanje ugljen-dioksida kod kopnenih organizama praćeno je velikim gubitkom vode putem isparavanja (Hadley, 1994a; Hadley, 1994b). Razvoj unutrašnjih disajnih puteva kod organizama koji su prešli iz vode na kopno predstavlja efikasnu evolutivnu adaptaciju u zaštiti od dehidracije. Osim toga, zaštita od zračenja je efikasnija u vodi, jer sunčevi zraci imaju mnogo manju prodornu moć u odnosu na vazduh, te su kopneni organizmi više izloženi negativnim uticajima zračenja i temperaturnih promena u odnosu na vodene. Zbog polarnosti molekula vode dolazi do uspostavljanja međumolekulskih vodoničnih veza koje značajno menjaju fizičko-hemijske osobine vode, čineći je najrasprostranjenijim i najstabilnijim rastvaračem u prirodi (Danks, 2000).



U odnosu na vodena staništa, na kopnu se organizmi suočavaju ne samo sa problemom gubitka, već i nedostatka, nedostupnosti ili dostupnosti vode u neadekvatnom agregatnom stanju. Zbog toga su kopneni organizmi, a među njima i insekti, tokom evolutivnog razvoja stekli brojne mehanizme za kontrolu prometa vode. Štaviše, postoje organizmi koji su stekli otpornost na ekstremnu dehidraciju preživljavajući u stanju anhidrobioze, jednoj od formi kriptobioza (Watanabe, 2006).

Kod insekata, kao i kod drugih organizama, voda čini najveći udeo u ukupnoj telesnoj masi (Tabela 1) i njen sadržaj se najčešće kreće oko 70% (Danks, 2000). U zavisnosti od razvojnog stadijuma, pola i uslova u kojima organizam živi, količina telesne vode može značajno varirati i kreće se u rasponu od 17% do preko 90% (Hadley, 1994a). Takođe, s obzirom na to da su molekuli vode uglavnom manji od ostalih organskih komponenti u živim sistemima, oni čine oko 95–99% svih molekula u organizmu (Edney, 1977).

**Tabela 1.** Sadržaj telesne vode (%) pojedinih vrsta insekata iz različitih redova.

Vrsta	Sadržaj vode (%)	Vrsta	Sadržaj vode (%)
<b>Collembola</b>		<b>Diptera</b>	
<i>Orchesella cincta</i>	72,5	<i>Drosophila melanogaster</i>	74,7
<i>Tomocerus minor</i>	73,5	<i>Sarcophaga crassipalis</i>	66,4
<b>Coleoptera</b>		<b>Lepidoptera</b>	
<i>Tenebrio molitor</i>	67	<i>Bombyx mori</i>	70–79
<i>Perimylops antarcticus</i>	75		

Iako se količina vode razlikuje među tkivima u organizmu, sadržaj vode se mora održavati u granicama fiziološke tolerancije tkiva i organa. Nekontrolisano unošenje hipoosmotske tečnosti i posledični ulazak vode u ćelije mogu izazvati bubrenje ćelija, njihovo pucanje, ili pak mogu poremetiti metaboličke procese razređujući metabolite ćelije. Sa druge strane, prevelika dehidracija može takođe uticati na metabolizam, ali može izazvati i oštećenja membrana i drugih ćelijskih struktura (Hadley, 1994a).

Na osnovu aktivnosti vode ( $a_w$ ), koja predstavlja meru njene dostupnosti u živim sistemima (Pottis, 1994), voda se može podeliti na dva oblika – *slobodna*, osmotski aktivna voda (OA, od *engl.* osmotically active) i *vezana*, osmotski neaktivna voda (OI, od *engl.* osmotically inactive). OA voda je zastupljenija i predstavlja osnovni slobodni oblik u kome se odvijaju svi metabolički procesi. Sa druge strane, OI je voda koja je vezana za makromolekule i druge ćelijske strukture, a doprinosi očuvanju bazalnog nivoa vode potrebnog za održavanje homeostaze. Vezane vode ima manje u telu insekata i ona čini oko 15–20% ukupne sveže mase (Block, 2003).

Tokom aktivnog razvoja organizma količina OA vode je promenljiva i zavisi od razvojnog stadijuma, vrste tkiva, organa, kao i fiziološkog statusa organizma (perioda hranjenja, pojenja i slično). Na sadržaj OA vode, glavnog rastvarača u ćeliji, utiče i količina njegovih rastvoraka, posebno onih sa visokom osmotskom aktivnošću koji za sebe vezuju molekule vode i prevode je iz osmotski aktivne u neaktivnu formu.

Sadržaj vode se tokom faze mirovanja najčešće smanjuje, što je karakteristično i za dijapauzu. Ipak, količina izgubljene vode (stepend dehidracije) se razlikuje među vrstama i zavisi od razvojnog stadijuma na kom nastupa mirovanje, vrste staništa i sezone. Najčešće se smanjuje količina OA vode, a sadržaj OI ili ostaje nepromenljiv ili raste (Worland, 1996; Danks, 2000). Organizmi koji se tokom faze mirovanja ne hrane i ne poje suočeni su sa velikim izazovom – očuvanjem telesne vode, posebno ukoliko faza mirovanja traje dugo. Osim toga, stresogeni faktori tokom mirovanja (niske/visoke temperature, anoksija i slično) dodatno otežavaju preživljavanje ovih organizama, jer najčešće direktno modulišu fizičko-hemijske osobine vode i utiču na njenu dostupnost. Takođe, očuvanje vode je dormantim organizmima otežano zbog toga što mnogi mehanizmi kontrole prometa vode koji se koriste tokom aktivnog života nisu dostupni i tokom mirovanja (Danks, 2000).

Zbog svega navedenog, tokom dormancije postoje brojni specifični bihevioralni, morfološki, fiziološki, biohemijski i molekulski mehanizmi koji su uključeni u zaštitu od dehidracije (Hadley, 1994a; Danks, 2000; Goyal i dr., 2005; Watanabe, 2006). Promene u ponašanju predstavljaju okupljanja jedinki u grupe i njihovo

rotiranje unutar grupe, od unutrašnjosti grupe ka spoljašnjosti, čime se postiže zaštita cele grupe. Grupisanjem jedinki smanjuje se odnos ukupne površine isparavanja i zapremine, u odnosu na onaj kod pojedinačne jedinke. Takođe, one jedinke koje se nalaze u spoljašnjem prstenu grupe najviše su izložene dehidraciji i rotiraju se sa ostalim jedinkama iz unutrašnjosti, čime se povećava stepen preživljavanja u grupi (Watanabe, 2006).

Morfološki mehanizmi zaštite od gubitka vode tokom dijapauze uključuju promene u građi kutikule i lučenje zaštitnih opni od sluzi i svile, a fiziološke mere zaštite se ogledaju u prestanku varenja i ekskrecije, smanjenju nivoa respiracije i povećanju sadržaja lipida u telu (Hadley, 1994a).

Takođe, povećanjem osmotski aktivnih materija u telu, vezuje se voda i smanjuje njeno isparavanje. Među najpoznatijim „zaštitnicima“ od dehidracije i niskih temperatura su polioli, šećeri i neke slobodne amino-kiseline. Kod zglavkara se tokom dijapauze ili kriptobioze u velikim koncentracijama sintetišu glicerol, trehaloza i prolin. Osim pomenutih jedinjenja, u značajnim količinama se sintetišu i inozitol i glukoza (Kojić, 2009).

Dijapauzirajuće gusenice kukuruznog plamenca, *Ostrinia nubilalis*, u početku dijapauze akumuliraju veliku količinu glikogena, koja se na nižim temperaturama smanjuje, dok u isto vreme raste nivo glicerola. Na kraju hladne sezone, kada opadne nivo glicerola kao krioprotektora, nivo glikogena ponovo raste (Grubor-Lajšić i dr., 1991). Poznato je da glikogen-fosforilaza, glavni enzim katabolizma glikogena, biva aktivirana dejstvom niskih temperatura (Storey i Storey, 2012). Takođe, pad temperature dovodi do povećanja broja akvaporina u membranama i posledičnog transporta vode iz ćelija u telesna tkiva i međućelijski prostor, a glicerola u obrnutom smeru – u ćelije (Izumi i dr., 2007). Ujedno, niske temperature aktiviraju ekspresiju specifične grupe gena (više informacija napisano je u odeljku 1.4.1 *Ekspresija gena i sinteza proteina*) koji omogućavaju brzu zaštitu organizma od uticaja hladnoće (Li i Denlinger, 2008).

### 1.3.2 Akumulacija energetske rezervi

Insekti se najčešće ne hrane tokom dijapauze (Hahn i Denlinger, 2007). Vrste koje dijapauziraju u stadijumu lutke ili embriona (jaja) se ni ne mogu hraniti, dok one u stadijumu larve ili adulta mogu, ali je to retka pojava. Insekti se najčešće intenzivno hrane pre dijapauze, kako bi nagomilali nutrijente za dug period mirovanja. Osim toga, na očuvanje rezervi tokom dijapauze utiče i sniženje stope bazalnog metabolizma, smanjena aktivnost, kao i niske temperature koje su karakteristične u ovom periodu kod mnogih dijapauzirajućih vrsta. Nutritivni status jedinke utiče i na period izlaska iz dijapauze, posebno ukoliko uslovi za kontinuiranu ishranu još uvek nisu povoljni (Hahn i Denlinger, 2007).

Lipidi, ugljeni hidrati i amino-kiseline predstavljaju tri najvažnija izvora energije u dijapauzi. Glavni rezervni polisaharid je glikogen koji mnoge vrste, u neposrednom odgovoru na niske temperature, razgrađuju do glukoze i usmeravaju na sintezu glicerola. Ipak, insekti najčešće akumuliraju rezervne materije u vidu lipida i proteina, jer se rezerve glikogena brzo troše.

Lipidi se najčešće akumuliraju u masnom telu u vidu triacilglicerola i tokom dijapauze postepeno se troše aktivnošću lipaza koje ih razlažu na masne kiseline i glicerol. Potom, masne kiseline se koriste kao metaboličko gorivo dok je glicerol važan metabolit u zaštiti od niskih temperatura (Hahn i Denlinger, 2007, 2011).

Rezervni proteini predstavljaju izvor amino-kiselina i kod insekata su najzastupljeniji heksamerini koji se sintetišu u masnom telu, a potom izlučuju u hemolimfu odakle ih preuzimaju ostala tkiva. Heksamerini su dobili naziv po tome što su sastavljeni od šest identičnih subjedinica, iako postoje i izuzeci od ovog pravila. Najčešće imaju visok sadržaj aromatičnih amino-kiselina zbog čega se nazivaju i arilforini (Denlinger, 2002). Tokom aktivnog razvoja, heksamerini se brzo preuzimaju iz hemolimfe, jer učestvuju u biosintetskim procesima. Sa druge strane, tokom dijapauze, heksamerini se nalaze u visokim koncentracijama u hemolimfi, gde predstavljaju izvor amino-kiselina neophodnih za brz nastavak razvoja posle mirovanja (Taški i dr., 2004), ali i kao izvor slobodnih aminokiselina koje imaju zaštitna svojstva tokom dehidracije kao npr. prolin, alanin, valin i druge.

Osim heksamerina, kod nekih insekata je utvrđeno da se tokom dijapauze u većim količinama sintetišu aktin i drugi proteini citoskeleta koji mogu imati važnu ulogu u unutarćelijskom transportu i mehaničkoj zaštiti ćelija od efekata niskih temperature i dehidracije (Kim i dr., 2006).

### 1.3.3 Supresija metabolizma

Ulaskom u stanje mirovanja smanjuje se intenzitet metabolizma što daje mogućnost organizmima da prežive nepovoljne uslove kroz duži vremenski period, a na račun katabolizma uskladištenih rezervnih materija (Denlinger, 2002). Kod insekata se nivo metabolizma smanjuje za 70–98%, a energetska potrošnja svodi se na minimum, pre svega smanjenjem procesa sa najvećim energetske utroškom, kao što su deoba ćelija, diferencijacija tkiva i rast (Storey i Storey, 1991, 2004). Takođe, i niske temperature dovode do usporavanja metaboličkih procesa i doprinose smanjenju opšte stope metabolizma. Storey i Storey (2012) smatraju da je niska temperatura glavni okidač koji dovodi do aktivacije signalnih kaskada u ćeliji, koje vode adaptaciji i preživljavanju nepovoljnih uslova.

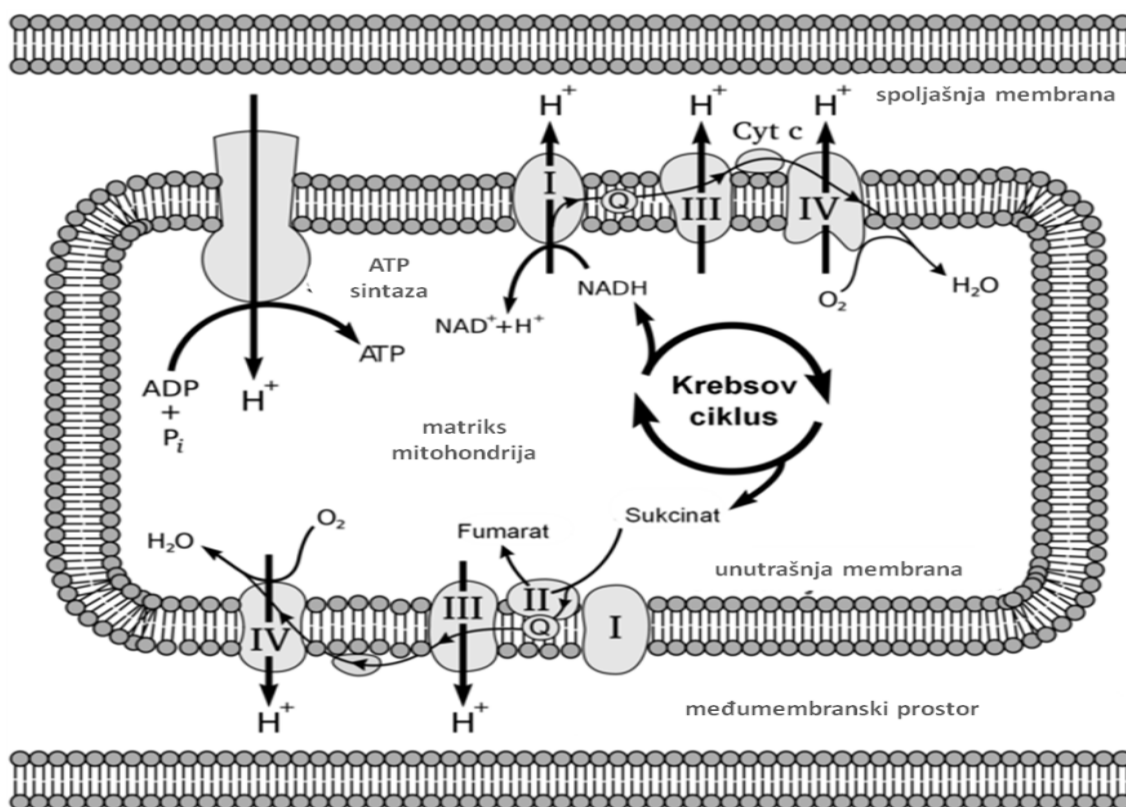
Niske temperature, prestanak rasta i ulazak u dijapauzu, kod insekata hladnih područja, smanjuje potrebu za proizvodnjom ATP-a (adenozin-trifosfat). Pokazano je da tokom dijapauze dolazi do nakupljanja krajnjih produkata glikolize (laktat i alanin), što ukazuje da se vrste koje izbegavaju mržnjenje telesnih tečnosti oslanjaju tokom zime na anaerobni metabolizam i time smanjuju potrebu za velikim brojem mitohondrija (Storey i Storey, 1985). Ipak, ne postoje dokazi o potpunom prekidu aerobnog metabolizma kod datih vrsta.

#### *Uloga mitohondrija u supresiji metabolizma*

Mitohondrije su male ćelijske organele pomoću kojih se odvija ćelijsko disanje, zbog čega su ključne za kontrolu intenziteta oksidativnog metabolizma. Obavijene su dvema membranama između kojih se nalazi međumembranski prostor (Slika 4). Mitohondrije su ispunjene tečnim matriksom u kome se nalaze kružni molekuli

mitohondrijske DNK, set mitohondrijskih ribozoma, brojni metaboliti i enzimi koji učestvuju u različitim metaboličkim procesima kao što su Krebsov ciklus, ciklus uree, biosinteza hema i drugih metabolita (Krauss, 2001).

Fizičko-hemijske osobine spoljašnje i unutrašnje membrane mitohondrija se značajno razlikuju – spoljašnja membrana ima više lipida i propustljivija je od unutrašnje membrane koja sadrži više proteina u svom sastavu (~80%) i poseduje veću selektivnost, predstavljajući važnu barijeru između matriksa mitohondrija i citosola (Krauss, 2001). Unutrašnja membrana se često uvija formirajući kriste koje zalaze u matriks, čime se povećava aktivna dodirna površina između membrane i matriksa. Ovo je naročito važno zbog toga što se na unutrašnjoj membrani nalaze brojni transportni proteini, kao i enzimi koji učestvuju u oksidativnoj fosforilaciji: kompleksi respiratornog lanca (I–IV) i ATP sintaza (Slika 4).



**Slika 4.** Mitohondrije – elektron-transportni lanac i sinteza ATP-a (Internet 1).

Elektron-transportni lanac učestvuje u prenosu elektrona sa redukovanih ekvivalenata (NADH, FADH<sub>2</sub>), koji nastaju u različitim kataboličkim procesima, do molekuskog kiseonika, kao krajnjeg akceptora elektrona. Prema hemiosmotskoj teoriji, energija za sintezu ATP-a se obezbeđuje pumpanjem protona (H<sup>+</sup>) u međumembranski prostor, nasuprot gradijentu njihove koncentracije, od strane kompleksa I, III i IV. Na taj način se uspostavlja elektrohemijski potencijal između međumembranskog prostora i matriksa koje razdvaja unutrašnja mitohondrijska membrana (Slika 4). Energija prolaska protona u pravcu gradijenta kroz kanal koji čini deo enzimskog kompleksa ATP sintaze, koristi se za sintezu ATP-a od ADP-a i Pi (Slika 4).

Respiratorni lanac čine četiri složena kompleksa:

1. *NADH–koenzim Q reduktaza (NADH dehidrogenaza ili kompleks I)* je prvi i najveći enzimski kompleks koji se sastoji od nekoliko desetina subjedinica i direktno je uključen u održavanje ćelijske redoks homeostaze (odnos NADH+H<sup>+</sup> i NAD<sup>+</sup>). Kompleks I prihvata redukcijske ekvivalente sa NADH+H<sup>+</sup> i prenosi ih na koenzim Q, pumpajući protone u međumembranski prostor. Takođe, ovaj kompleks predstavlja jedan od izvora reaktivnih kiseoničnih vrsta u ćeliji (ROS, skraćeno od *engl.* reactive oxygen species) (opširnije u delu *Antioksidativna zaštita*). Najveći broj subjedinica ovog kompleksa je kodiran jedarnom, a samo manji broj mitohondrijskom DNK.
2. *Sukcinat–koenzim Q reduktaza (kompleks II)* katalizuje oksidaciju sukcinata do fumarata i prenosi elektrone sa FADH<sub>2</sub> do koenzima Q. Ovo je jedini kompleks čije su sve subjedinice (flavoprotein, gvožđe-sumporni protein, mala i velika subjedinica citohroma b) u potpunosti kodirane jedarnim genomom. Takođe, kompleks II ne učestvuje u pumpanju protona u međumembranski prostor.
3. *Koenzim Q – citohrom c reduktaza (kompleks III)* je lipoproteinski kompleks koji katalizuje prenos elektrona od redukovanog koenzima Q do citohroma c. Ovaj kompleks se sastoji od dva citohroma b, jednog citohroma c1 i grupe gvožđe-sumpor proteinskih subjedinica. Prilikom prenosa elektrona učestvuje u pumpanju protona u međumembranski prostor.

4. *Citohrom c oksidaza (COX, kompleks IV)* je poslednji kompleks respiratornog lanca koji prenosi elektrone od citohroma *c* do krajnjeg primaoca, molekuskog kiseonika, koji se redukuje do vode. Tokom prenosa elektrona učestvuje u pumpanju protona u međumembranski prostor, doprinoseći stvaranju elektrohemijuskog gradijenta čiji potencijal se koristi za sintezu ATP-a. Kompleks IV se sastoji od desetak ili više subjedinica koje su kodirane i jedarnom i mitohondrijskom DNK.

*ATP sintaza* je veliki membranski kompleks (Slika 4) koji pojedini autori nazivaju kompleks V. Sastoji se od velikog broja subjedinica koje grade kanal koji prolazi kroz unutrašnju membranu i povezuje međumembranski prostor sa matriksom. Prolaskom protona kroz kanal se obezbeđuje energija za sintezu ATP-a od neorganskog fosfata ( $P_i$ ) i ADP-a (Slika 4). Sintetisani molekuli ATP-a se otpuštaju u matriks, odakle se prenose u citosol preko adeninnukleotid translokaze (ANT).

*ADP/ATP translokaza* je adenine-nukleotid translokaza (ANT) koja se nalazi se na unutrašnjoj membrani mitohondrija i čini čak 10% ukupnih proteina unutrašnje membrane, što ukazuje na njenu značajnu ulogu. U zavisnosti od biološke vrste, postoji više izoformi ADP/ATP translokaze koje su kodirane na hromozomskoj ili mitohondrijskoj DNK i koje mogu biti tkivno specifične. Kod čoveka su opisane četiri izoforme koje imaju tkivno-specifičnu distribuciju (Dolce i dr., 2005).

Prenos adeninskih nukleotida se odvija uz potrošnju energije, a procenjuje se da se čak 30% energije dobijene oksidativnom fosforilacijom troši na rad ADP/ATP translokaze (Halestrap i Brenner, 2003). Razmena slobodnih ATP i ADP se odvija u stehiometrijskom odnosom 1:1, što doprinosi održavanju nivoa ovih nukleotida konstantnim. S obzirom na to da adeninski nukleotidi predstavljaju alosterne modulatore i signalne molekule koji mogu uticati na brojne ćelijske procese, regulacija njihovog odnosa je od ključnog značaja za vijabilnost ćelije (opširnije u delu *Regulacija ćelijske smrti tokom gladovanja i stanja produženog hipometabolizma*).



Međusobni odnos adeninskih nukleotida u ćeliji, koji odražava energetske status, naziva se energetske naboje (EC, *engl.* energy charge) i kvantitativno se izražava sledećom jednačinom:

$$EC = \frac{[ATP] + \frac{1}{2} [ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

U ćeliji se najčešće nalazi veći broj mitohondrija, što zavisi od energetske potreba ćelije i tkiva. S obzirom na to da mitohondrije učestvuju u aerobnom metabolizmu, tkiva koja imaju visoku stopu metabolizma (npr. mišići, jetra i drugi) obično imaju veliki broj mitohondrija u citoplazmi.

Tokom mirovanja najčešće dolazi do smanjenja respiratornog kapaciteta organizma čime se postiže dvostruka korist:

- 1) smanjuje se proizvodnja reaktivnih, potencijalno opasnih, kiseoničnih vrsta – npr. superoksid radikala koji nastaju na kompleksu I elektron-transportnog lanca,
- 2) kod vrsta otpornih na zamrzavanje, smanjuje se rizik od potencijalnog oštećenja mitohondrijskih membrana koje bi moglo nastati kao posledica zamrzavanja dela unutarćelijske i unutarmitohondrijske tečnosti.

Aktivnost većine mitohondrijskih enzima je kod dormantnih organizama supresovana tokom zimskih meseci. Uočeno je smanjenje aktivnosti citrat sintaze, NAD<sup>+</sup>-izocitrat dehidrogenaze, glutamat dehidrogenaze i piruvat dehidrogenaze (Joanisse i Storey, 1994). Takođe, tokom zimskih meseci, dokazano je i smanjenje aktivnosti citohrom c oksidaze, krajnjeg enzima elektron-transportnog lanca, za 30 do 50% (McMullen i Storey, 2008). Smanjena aktivnost mitohondrijskih enzima može biti uzrokovana metaboličkom regulacijom i/ili smanjenjem ukupnog broja mitohondrija tokom zimskih meseci (Kukal i dr., 1989).

Potrošnja kiseonika je smanjena dva do tri puta tokom dijapauze kukuruznog plamenca (McLeod i Beck, 1963). Elektronska mikrofografija preparata mitohondrija

sugeriše da se njihov broj verovatno smanjuje (Jovanović-Galović, 1997). Samim tim, brza i efikasna biogeneza mitohondrija je ključna za nastavak životnog ciklusa organizma nakon završetka perioda mirovanja, a u regulaciji biogeneze mitohondrija učestvuju, između ostalih, i proteini prohibitini (Artal-Sanz i dr., 2003).

*Prohibitini (PHB)* pripadaju evolutivno očuvanoj porodici proteina koju čine dva člana – prohibitin 1 (PHB1) i prohibitin 2 (PHB2), visoke homologije od 50% istih amino-kiselinskih ostataka. PHB1 i PHB2 grade fiziološki aktivan heterokompleks na unutrašnjoj membrani mitohondrija, mada se mogu naći i u jedru i u ćelijskim membranama (Coates i dr., 1997; Nijtmans i dr., 2002). Konstitutivno se ekspresuju u svim eukariotskim ćelijama, a osnovna uloga im je pravilno uspostavljanje kompleksa respiratornog lanca tokom biogeneze mitohondrija (Artal-Sanz i dr., 2003).

Prohibitinima se, takođe, pripisuju i brojne druge uloge – od povezanosti sa starenjem, preko regulacije apoptoze i proliferacije ćelija, do veze sa različitim bolestima: inflamacijom, gojaznošću, kancerom i drugim (Nijtmans i dr., 2002). Poznato je da mogu imati i antioksidativno dejstvo (Theiss i dr., 2007).

## 1.4 Odgovor na stres u dijapauzi

Proučavanje biohemijske i molekulske osnove dijapauze ubrzano je savremenim transkriptomskim i proteomskim metodama u poslednjih 15 godina. Rezultati različitih studija pokazali su da postoje specifični obrasci ekspresije gena čiji su produkti uključeni u regulaciju energetskeg metabolizma, sintezu hormona, usklađivanje cirkadijalnog i cirkannualnog ritma, sintezu različitih proteina stresa, enzima i molekula antioksidativnog sistema zaštite (MacRae, 2010; Carrasco i dr., 2011; Storey i Storey, 2012).

### 1.4.1 Ekspresija gena i sinteza proteina

Za razliku od iRNK, sinteza većine proteina se smanjuje u hipometabolizmu, s obzirom na to da zahteva velike količine energije (Hochachka i Somero, 2002). Ipak, translacija se ne obustavlja već se u ćeliji sintetišu samo oni proteini koji imaju vitalnu ulogu u preživljavanju.

Na promene uslova spoljašnje sredine organizmi odgovaraju sličnim, zajedničkim mehanizmima koji, između ostalog, gotovo uvek podrazumevaju i povećanu sintezu proteina toplotnog stresa. Proteine toplotnog stresa slučajno je otkrio Ferruccio Ritossa 1962. godine kod vinske mušice, *D. melanogaster* i opisao ih kao grupu proteina čija se sinteza indukuje toplotnim stresom u cilju zaštite ćelije. Danas se zna da se proteini toplotnog stresa, osim u različitim vrstama stresa, konstitutivno sintetišu i učestvuju u održavanju osnovnih ćelijskih funkcija i procesa (*engl.* housekeeping function).

Broj *Hsp* gena koji kodiraju raznoliku familiju proteina toplotnog stresa široko varira kod različitih organizama. Ekspresija *Hsp* je primarno regulisana transkripcionim faktorima HSF (*engl.* heat shock factor) koji se vezuju za visoko konzervisane HSE elemente (*engl.* heat shock element) u 5' promotorskom regionu HSP gena, ali i drugih gena čiju ekspresiju regulišu (Morimoto, 1993). Takođe, *Hsp* geni poseduju i druge regulatorne elemente sem HSE, čime je omogućena transkripciona aktivacija preko različitih signalnih puteva. Osim transkripcione regulacije, mnogi članovi superfamilije proteina toplotnog stresa podležu i

regulaciji posttranslacionim modifikacijama – fosforilacijom, karbonilacijom, protein-protein interakcijama i oligomerizacijom. Za regulaciju sinteze i aktivnosti HSP70 i HSP90 familije naročito su važne protein-protein interakcije koje se ostvaruju sa ko-šaperonima (*engl.* co-chaperones) kao što su DnaJ (HSP40), Hop (Hsp-organizujući protein) i Hip (Hsp-interagujući protein) i brojni drugi. Ove interakcije i posttranslacione modifikacije čine proteine toplotnog stresa osjetljivim, omogućavajući im da brzo i efikasno reaguju na promene u ćelijskoj sredini (Stetler i dr., 2010).

U normometabolizmu članovi HSP familije se sintetišu umereno, jer učestvuju u ranim stadijumima sinteze proteina, savijanju (*engl.* folding) i transportu novosintetisanih proteina iz citosola u različite unutarćelijske odeljke. Sa druge strane, u stresnim uslovima, kada su sinteza, savijanje i spajanje drugih proteina otežani, povećana ekspresija, sinteza i akumulacija HSP sprečava nakupljanje nefunkcionalnih proteina i njihovih agregata povećavajući šansu za preživljavanje i brži oporavak ćelije. Danas je poznato da HSP proteini doprinose sticanju termotolerancije, ali da se povećano sintetišu u odgovoru na izlaganje teškim metalima, u hipoksiji, oksidativnom stresu, UV zračenju i gladovanju (Kregel, 2002; Welch, 2009).

Proteini toplotnog stresa se klasifikuju na osnovu približne molekulske mase i sličnosti u sekvenci na: (1) HSP90 familiju, (2) HSP70 familiju, (3) HSP60 familiju i (4) familiju malih proteina toplotnog stresa (sHSP, skraćeno od *engl.* small heat shock proteins), čija molekulska masa varira od 20 do 30 kDa (Tachibana i dr., 2005). Veliki broj naučnih studija potvrdio je da se sinteza HSP povećava u dijapauzi insekata iz različitih redova – Diptera (Chen i dr., 2005), Lepidoptera (Sonoda i dr., 2006), Coleoptera (Yocum, 2001) i Hymenoptera (Yocum i dr., 2005). Na primer, kod muve *S. crassipalpis* eksperimentalno je dokazano da se u dijapauzirajućim lutkama tokom zimskih meseci povećava ekspresija *Hsp23*, *Hsp70*, *Hsp60* i brojnih malih HSP (Yocum i dr., 1998; Rinehart i dr., 2000; Rinehart i dr., 2007). Takođe, osim u dijapauzi insekata, povećanje sinteze HSP utvrđeno je u dormantnim stanjima drugih beskičmenjaka kao što su *Artemia franciscana* (vrsta raka) (Day i dr., 2003) i *Spongila lacustris* (slatkovodni sunđer) (Schill i dr., 2006),

ali i u hibernaciji mnogih sisara (Eddy i dr., 2005; Carey i dr., 1999). Kod polarnih organizama, larvi insekta *Belgica antarctica* (Rinehart i dr., 2006), antarktičke ribe *Trematomus bernacchii* i antarktičkog morskog trepljara *Euplotes focardii* (Rinehart i dr., 2007) utvrđeno je da se HSP sintetišu kontinuirano.

Činjenice da se različiti proteini toplotnog stresa različitom stopom sintetišu tokom dijapauze kao i da je njihova ekspresija konstitutivna kod polarnih organizama, ukazuju na to da HSP proteini imaju raznovrsne i važne funkcije u adaptaciji organizama na niske temperature. S tim u vezi, ekspresija HSP kod insekata danas se ne smatra samo trenutnim odgovorom na termalni stres već delom opštih mehanizama adaptacija na niske temperature (Rinehart i dr., 2007). U prilog tome govore i rezultati bioinformatičke studije u kojoj su analizirani podaci iz naučnih studija na različitim organizmima, a kod kojih je praćena ekspresija različitih gena i sinteza proteina u odgovoru na niske temperature (Carrasco i dr., 2011). Obuhvaćeni su kod 34 različita organizma iz različitih carstava i formirana je jedinstvena baza podataka sa preko dve hiljade gena/proteina. Među brojnim genima i proteinima utvrđeno je da je ekspresija i sinteza većine članova HSP povećana u odgovoru na niske temeprature (Carrasco i dr., 2011).

Osim HSP, tokom različitih vrsta mirovanja povećava se ekspresija i sinteza LEA proteina (*engl.* late embryogenesis abundant proteins), feritina, različitih enzima i molekula uključenih u antioksidativnu zaštitu, metabolizam ugljenih hidrata i lipida koji su važni u adaptaciji na niske temperature i dehidraciju (MacRae, 2010; Storey i Storey, 2012).

LEA proteini su mali, strukturno neuređeni i izrazito hidrofilni proteini. Ovi protieni u stresnim uslovima dehidracije unutar ćelija formiraju molekulske štitove (*engl.* molecular shields) oko makromolekulskih struktura i proteina štiteći ih od denaturacije i agregacije. LEA proteini su otkriveni u biljnom semenu sedamdesetih godina prošlog veka, a osim kod biljaka povećano se sintetišu u odgovoru na dehidraciju fungivorne nematode *Aphelenchus avenae*, vodenih mećića (Tardigrada), cîsta pojedinih raćića iz roda *Artemia*, larvi muve *Polypedilum*

*vanderplanki*, rotifera *Adineta ricciae* i *Brachinus plicatilis*, kao i arktičke kolebole *Megaphorura arctica* (Goyal i dr., 2005; MacRae, 2010; Popović i dr., 2011; Chakrabortee i dr., 2012; Yamaguchi i dr., 2012; Clark i dr., 2012).

Tokom dijapauze, ili drugih strategija mirovanja, kao odgovor na stres često je povećana sinteza proteina koji učestvuju u antioksidativnom sistemu zaštite kao što su katalaza, superoksid dismutaza, glutation S-transferaza, tioredoksin peroksidaza, peroksiredoksin, metionin sulfoksid reduktaza A i drugi (Minniti i dr., 2009; MacRae, 2010). Takođe, povećava se i sinteza proteina koji su uključeni u mobilizaciju energetske rezervi i sintezu osmolita koji učestvuju u zaštiti od efekata niskih temperatura. Kod muve *B. antarctica* tokom mirovanja, kao odgovor na dehidraciju i termalni stress povećava se ekspresija glikogen fosforilaze, fosfoenolpiruvat karboksikinaze, trehaloz-6-fosfat fosfataze, trehalaze, sorbitol dehidrogenaze i drugih (Teets i dr., 2012). Kod vatrene stenice (*Pyrrhocoris apterus*) praćena je dinamika ekspresije gena u dijapauzi i utvrđeno je da se tokom trajanja dijapauze ekspresija citrat sintaze, aldoza reduktaze i sorbitol dehidrogenaze kontinuirano povećava. Međutim, ekspresija gena za receptor za ekdizon i USP, a čiji produkti učestvuju u regulaciji cirkadijalnog ritma, je smanjena (Košťál i dr., 2008).

U dijapauzi može doći i do povećanja ekspresije i sinteze citoskeletalnih proteina, za koje se pretpostavlja da imaju važnu ulogu u adaptaciji organizma na niske temperature. Kod komarca *Culex pipiens* utvrđeno je da se u dijapauzi i odgovoru na niske temperature ne samo povećava transkripcija gena za aktin, već se odvija i redistribucija ovog proteina unutar određenih tkiva (Kim i dr., 2006). Takođe, kod rotifere *Brachionus plicatilis* transkriptomске analize su pokazale da je u dugom mirovanju u embrionalnom stadijumu značajno povećana ekspresija različitih gena proteina citoskeleta (Clark i dr., 2012), potvrđujući pretpostavku da citoskelet može imati važnu ulogu u ćelijskoj adaptaciji tokom dormancije.

*Povećanje transkripcije i/ili produžetak poluživota i akumulacija iRNK?*

Osim aktivnog povećanja transkripcije gena, u toku nekih vrsta dormancije uočena je i pojava produžetka poluživota i nakupljanje iRNK (MacRae, 2010). Na primer, kod račića *A. franciscana*, čije ciste mogu da žive i nekoliko desetina godina u dehidratisanom stanju, uočeno je da se tokom mirovanja smanjuje transkripcija u jedaru, a produžava poluživot iRNK (van Breukelen i dr., 2000). Takođe, kod istog organizma je uočeno da u uslovima mirovanja izazvanog anoksijom poliadenilacija iRNK ima različite efekte na mitohondrijske i citosolne iRNK populacije. Naime, kada su poliadenilovane iRNK u mitohondrijama, njihov životni vek je skraćen, za razliku od jedarnih iRNK čiji životni vek se produžava u citoplazmi usled povećane stabilnosti dodatkom poli-A sekvence (Eads i Hand, 2003).

Niska temperatura dvostruko utiče na produženje života iRNK – podstiče formiranje i stabilizaciju sekundarne strukture i smanjuje aktivnost RNaza, enzima koji degradiraju RNK. Pretpostavlja se da aktivna transkripcija zajedno sa produžetkom poluživota iRNK, kao posledica dejstva niskih temperatura, dovodi do nakupljanja velikog broja iRNK. Značaj nakupljenih transkripata se ogleda u tome što oni predstavljaju odličan izvor iRNK u periodu pred izlazak iz mirovanja, kada je organizmu važno da što brže sintetiše različite proteine neophodne za uspostavljanje aktivnog metabolizma i završetak mirovanja.

### 1.4.2 Antioksidativna zaštita

Tokom rane evolucije života na Zemlji pojava prvih fotoautotrofnih organizama (cijanobakterija), koje koriste vodu kao izvor elektrona za fotosintezu, dovela je do pojave slobodnog kiseonika ( $O_2$ ) u atmosferi. Veća količina kiseonika kasnije je omogućila pojavu heterotrofnih organizama koji više ne koriste sunčevu energiju već se potpuno oslanjaju na respiraciju kao izvor metaboličke energije. Ove promene su znatno ubrzale evoluciju živog sveta, ali su pred nove organizme postavile i nove izazove kao što je rešavanje problema nepotpune metaboličke redukcije kiseonika. Naime, metaboličkom redukcijom 97–99% molekula kiseonika se redukuje do vode, a preostalih 1–3% podleže procesu nepotpune redukcije kada nastaju različite reaktivne vrste kiseonika i azota (ROS/RNS, od *engl.* Reactive Oxygen/Nitrogen Species). S obzirom na to da ROS i RNS imaju veću oksidacionu sposobnost i manju selektivnost od molekula kiseonika, oni u većim količinama predstavljaju opasnost po ćeliju i organizam. Adaptacija živih sistema na sintezu ROS/RNS ne ogleda se samo u koegzistenciji sa njima i njihovom uklanjanju, već i u razvitku mehanizama regulacije brojnih fizioloških funkcija u kojima ROS/RNS učestvuju (Lane, 2003).

Slobodni radikali su molekuli koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona u svojoj atomskoj ili molekulskoj orbitali i imaju visok stepen reaktivnosti zbog težnje da naspareni elektroni ili predaju ili spare oduzimanjem elektrona od drugih molekula u blizini (Bergendi i dr., 1999). U biološkim sistemima najznačajniji su radikalski derivati kiseonika i azota koji se mogu podeliti u slobodno-radikalske i neradikalske oblike (Tabela 2).

**Tabela 2.** Pregled reaktivnih vrsta kiseonika i azota.

Slobodno-radikalski oblici		Neradikalski oblici	
superoksid anjon radikal	$\cdot O_2^-$	vodonik-peroksid	$H_2O_2$
hidroksil radikal	$\cdot OH$	hipohlorna kiselina	$HOCl$
hidroperoksil radikal	$HO_2\cdot$	ozon	$O_3$
alkosil radikal	$RO\cdot$	singlet kiseonik	$^1O_2$
peroksil radikal	$RO_2\cdot$	organski peroksid	$ROOH$
azot-oksil radikal	$\cdot NO$	peroksinitrit	$ONOO\cdot$



Nastanak ROS i RNS je sastavni deo metabolizma ćelije i kontroliše se održavanjem fine ravnoteže između prooksidativnih i antioksidativnih molekula. Kada u ćeliji dođe do narušavanja ove ravnoteže i do prekomerne sinteze ROS/RNS nastaje oksidativni, odnosno nitrozativni stres (Valko i dr., 2007). Ova pojava je sastavni deo mnogih biotskih i abiotskih procesa, a njene posledice su narušavanje strukture i funkcije biomolekula. Neki od štetnih efekata ROS/RNS su: oštećenje DNK, lipidna peroksidacija, oštećenje amino-kiselina u proteinima, inaktivacija specifičnih enzima preko oksidacije njihovih kofaktora itd. Oksidativni stres je povezan sa velikim brojem oboljenja, kao i procesom starenja.

Lipidna peroksidacija je lančana radikalska reakcija, a inicijator je najčešće hidroksil radikal ili singlet kiseonika. Krajnji produkti peroksidacije odlikuju se izrazitim mutagenim i kancerogenim svojstvima, mogu da reaguju i sa sulfhidrilnim grupama proteina, a kao posledica lipidne peroksidacije lipida u sastavu membrana ona gubi selektivnu propustljivost i fluidnost. Različita oboljenja, npr. ateroskleroza i hemolitička anemija, povezana su sa lipidnom peroksidacijom. ROS i RNS reaguju i sa bočnim ostacima amino-kiselina proteina, što dovodi do promena konformacije molekula, gubitka funkcije, a samim tim i povećanja proteolize ili formiranja toksičnih proteinskih agregata. Povećana koncentracija RNS dovodi do nitrilizovanja proteina. Posledice dejstva ROS/RNS na nukleinske kiseline mogu biti prekidi jednog ili oba lanca, razmena sestrinskih hromatida, unakrsno povezivanje DNK-DNK, modifikacije baza, oštećenja na šećernoj i fosfatnoj komponenti. Ovakve modifikacije genetskog materijala prvi su korak ka mutagenezi, kancerogenezi i starenju.

Pojava ROS i RNS u biološkim sistemima uslovlila je razvoj različitih enzimskih i neenzimskih mehanizama za odbranu ćelije koji zajedno i sinhronizovano čine tzv. sistem antioksidativne zaštite (ADS, *engl.* antioxidative defense system).

### 1.4.2.1 Enzimski sistem zaštite

Enzimski sistem zaštite čine enzimi koji uklanjaju reaktivne oblike kiseonika i azota nastale tokom normalnog ćelijskog metabolizma ili kao posledica stresa. Najznačajniji enzimi su superoksid-dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation S-transferaza (GST), glutation reduktaza (GR) i glutation peroksidaza (GPx).

*Superoksid-dismutaza* (EC 1.15.1.1) je metaloprotein koji katalizuje dismutaciju superoksid anjon radikala do molekula kiseonika i vodonik-peroksida u reakciji koja je 1 000 puta brža od spontane. Poznata su četiri oblika ovog enzima, svi katalizuju reakciju sa različitom efikasnošću, a razlikuju se po metalu prisutnom u aktivnom centru i ćelijskom odeljku u kome deluju (Fridovich, 1995).

*Katalaza* (EC 1.11.1.6) je enzim izgrađen od četiri identične subjedinice, raspoređene u obliku tetraedra, koji katalizuje razlaganje vodonik-peroksida do vode i kiseonika. Ona poseduje i peroksidaznu aktivnost koristeći metanol, etanol, mravlju kiselinu ili fenol kao donore H<sup>+</sup>. Najveća aktivnost katalaze je u peroksizomima, gde je i sinteza H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> najveća.

*Glutation S-transferaza* (EC 2.5.1.18) je jedan od najvažnijih enzima u odbrani ćelije od hemijskih toksina i oksidativnog stresa. GST katalizuje reakciju konjugacije redukovanog glutationa (GSH) sa elektrofilnim supstratom (Sherratt i Hayes, 2001). Elektrofilni u reakciji mogu biti produkti oksidativnog metabolizma, npr. hidroperoksidi i lipidni peroksidi (ali ne i vodonik-peroksid) ili spoljašnji elektrofilni – različiti ksenobiotici (insekticidi). Takođe, GST je prenosnik steroidnih jedinjenja, prostaglandina i leukotriena (Sherratt i Hayes, 2001).

*Redoks sistemi.* Prenos elektrona između redoks aktivnih vrsta tokom ćelijskih procesa zavisi od redoks stanja ćelije, predstavljenog kao odnos redoks parova, poput GSH/GSSG, NAD<sup>+</sup>/NADH, NADP<sup>+</sup>/NADPH. U održavanju redoks homeostaze učestvuju dva glavna mehanizma – glutation redoks sistem i tioredoksin sistem, mada učestvuju i drugi činioci ADS (Holmgren, 1988; Holmgren i Fernandes, 2004).

### *Glutation redoks sistem*

Ovaj redoks sistem čine NADPH zavisna glutation reduktaza (GR), glutation (GSH/GSSG) i glutation peroksidaza (GPx). GPx redukuje organske perokside i vodonik-peroksid u prisustvu GSH koji se oksiduje do GSSG. Dalje, GSSG se zatim vraća u redukovanu oblik posredstvom GR i uz oksidaciju NADPH, čime se ciklus glutation redoks sistema zatvara.

*Glutation reduktaza* (EC 6.1.4.2) katalizuje redukciju disulfidne veze oksidovanog glutationa (GSSG), ali i drugih jedinjenja koja mogu nagraditi disulfide. GR štiti organizam od oksidativnog oštećenja održavajući visoku koncentraciju redukovanog glutationa, kosupstrata brojnih enzima značajnih za uklanjanje reaktivnih toksičnih vrsta. Kod nekih insekata distribucija aktivnosti GR je različita u odnosu na sisarske kod kojih je dve trećine aktivnosti u citoplazmi, a jedna trećina u mitohondrijama. Kod insekata aktivnost GR je viša u mitohondrijama nego u citoplazmi (Jovanović-Galović, 1997; Blagojević i Grubor-Lajšić, 2000).

*Glutation peroksidaza* (EC 1.11.1.19), GSH-Px ili GPx, katalizuje reakciju redukcije hidroperoksida uz istovremenu oksidaciju glutationa. GPx je tetramerni molekul čije subjedinice sadrže seleno-cisteinski ostatak. Kod sisara postoji više izoformi, koje se razlikuju kako po subćelijskoj distribuciji tako i po različitoj, tkivno-specifičnoj, ekspresiji i aktivnosti. GPx imaju važnu ulogu u zaštiti ćelije od lipidne peroksidacije, koja se intenzivno odvija u membrani. Mitohondrijska i citoplazmatska GPx mogu da uklanjaju lipidne perokside (LOOH), ali samo one koji su oslobođeni iz membrane, dok membranska, fosfolipid hidroperoksid glutation peroksidaza, može da deluje direktno na ove perokside. Osim unutarćelijske, postoje i vanćelijske izoforme GPx. Takođe, kod insekata nije detektovana aktivnost selen-zavisne GPx, nego selen-nezavisne GPx za koju se smatra da pripada izoformi GST i naziva se GST-Px.

### *Tioredoxin redoks sistem*

Ovaj redoks sistem uključuje tioredoksin (Trx-SH<sub>2</sub>/Trx-S<sub>2</sub>), NADPH zavisnu tioredoksin reduktazu (TR, TrxR) i tioredoksin peroksidazu (TPx). Slično prethodnom sistemu, ovaj sistem uključuje seriju reakcija koje zatvaraju ciklus oksidacije i redukcije tioredoksina. Tioredoxin je mali protein prisutan u citoplazmi, jedru i mitohondrijama. Ima ulogu antioksidansa u redoks kontroli, učestvuje u sintezi dezoksiribonukleotida, ćelijskoj proliferaciji i diferencijaciji, embriogenezi i apoptozi (Arner i Holmgren, 2000; Das, 2004). U tioredoksin redoks sistemu, tioredoksin služi kao donor elektrona tioredoksin peroksidazi (TPx), koja eliminiše organske perokside i vodonik-peroksid. Ponovnu redukciju oksidovanog tioredoksina katalizuje flavoprotein, tioredoksin reduktaza (TrxR), uz oksidaciju NADPH. Insekti koji nemaju glutation reduktazu, moraju se isključivo osloniti na Trx sistem u regulaciji nivoa redukovanog glutationa. Kod ovih organizama u enzimski nekatalizovanoj reakciji oksidovani glutation se redukuje, pri čemu je redukujući ekvivalent Trx-SH<sub>2</sub> koji se oksiduje do Trx-S<sub>2</sub> (Kanzok i dr., 2001).

### *Glutaredoksin redoks sistem*

*Glutaredoksini (Grx)* katališu GSH-zavisnu redukciju disulfida i GSH-mešanih disulfida mnogih proteina. Grx deluju i kao nosači elektrona u glutation-zavisnoj sintezi dezoksiribonukleotida pomoću ribonukleotid reduktaze, a učestvuju i u antioksidativnoj odbrani. Grx pripadaju familiji tioredoksina i predstavljaju male tiol-proteine (12 kDa) sa aktivni centrom karakterističnog motiva Cys-X-X-Cys ili Cys-X-X-Ser (Nilsson i Foloppe, 2004). Postoje u redukovanom ili oksidovanom obliku, kada dva cisteina uspostavljaju intramolekulsku disulfidnu vezu. Oksidovani oblik Grx se neenzimski redukuje sa GSH, jer, za razliku od tioredoksina, ne postoji oksido-reduktaza koja specifično redukuje Grx. GSH se potom regeneriše aktivnošću GR (Holmgren, 1988; Holmgren i Fernandes, 2004, Lilig i dr., 2008).

### 1.4.2.2 Neenzimski sistem zaštite

Neenzimske mehanizme antioksidativne zaštite čine mali molekuli, koji se mogu podeliti na hidrofilne i hidrofobne. U svim organizmima prisutan je već pomenuti glutation koji ima važnu ulogu u održavanju redoks balansa u citoplazmi i ćelijskim odeljcima, kao i u antioksidativnoj zaštiti. GSH je značajan supstrat u procesima regeneracije ostalih antioksidanata, kao što su vitamini C i E (Valko i dr., 2007).

Urati, soli mokraćne kiseline, su jaki redukujući agensi koji imaju sposobnost uklanjanja slobodnih radikala poput peroksil radikala, singlet kiseonika i lipidnih peroksida. Takođe, sprečavaju prooksidativno delovanje jona metala tako što ih vezuju za sebe (Baskin i Salem, 1997). Drugi značajni molekuli koji štite ćeliju od štetnog dejstva ROS/RNS su vitamin E i različiti pigmenti. Vitamin E je glavni membranski antioksidans i reaguje sa peroksil radikalima prekidajući reakciju lipidne peroksidacije, dok su karotenoidi dobri u uklanjanju singlet kiseonika, ali reaguju i sa drugim reaktivnim vrstama (Mortensen i dr., 1997). Melanin je pigment velike molekulske mase sa širokim spektrom različitih uloga, uključujući termoregulaciju, hemoprotekciju, kamuflažu i drugo (Riley, 1997). Takođe, on je i redoks-aktivan polimer uključen u reakcije transfera elektrona sa različitim redukujućih ili oksidujućih molekula i može imati dvojaku ulogu – delujući kao antioksidans ili kao izvor citotoksičnih jedinjenja. Kod insekata, prekursori melanina zajedno sa ROS i RNS predstavljaju sistem odbrane od parazitskih infekcija, međutim, oni su često citotoksični i za sâm organizam. Kod kukuruznog plamenca utvrđena je povezanost produkcije melanina i vodonik-peroksida tokom dijapauze (Kojic i dr., 2009).

Proteini koji učestvuju u održavanju homeostaze metalnih jona takođe se mogu svrstati u grupu molekula koji predstavljaju komponentu neenzimskog sistema antioksidativne zaštite. Mehanizam delovanja ovih proteina na ROS i RNS je najčešće dvojak – *direktan*, kada reaguju sa ROS i RNS preko sulfhidrilnih (SH) grupa, ili *indirektan* kada transportom ili skladištenjem metalnih jona, koji učestvuju u Fentonovoj reakciji, deluju preventivno sprečavajući nastanak reaktivnih vrsta. Proteini koji učestvuju u regulaciji metabolizma metalnih jona su

brojni i raznovrsni, a metalotioneini i feritini su jedni od najznačajnijih i najbolje proučenih.

### *Metalotioneini*

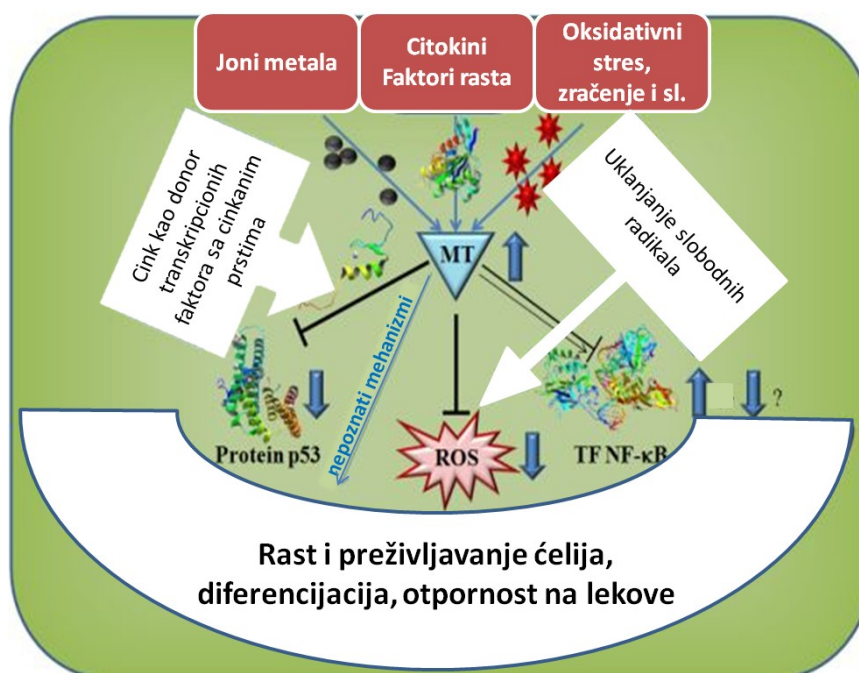
Metalotioneini (Mtn) su proteini male molekulske mase koji su svrstani u superfamiliju unutarćelijskih metaloproteina i metalopeptida koji vezuju metale formirajući merkaptide. Metalotioneini su prvi put izolovani iz kore bubrega konja i opisani kao kadmijumovi proteini (Margoshes i Vallee, 1957). Do danas, Mtn su identifikovani kod predstavnika svih životinjskih filuma kao i kod nekih gljiva, biljaka i cijanobakterija. Iako još uvek nije utvrđena njihova primarna funkcija u ćeliji, dokazano je da učestvuju u različitim ćelijskim procesima, kako u održavanju homeostaze organizma, tako i u nastanku i održavanju patoloških stanja (Coyle i dr., 2002). Do sada najbolje istražene funkcije metalotioneina su održavanje homeostaze esencijalnih metalnih jona ( $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ), kao i zaštita od povećanog, akutnog ili hroničnog izlaganja jonima teških metala (Carpene i dr., 2007).

Metalotioneini su proteini male molekulske mase, između 500 i 14000 Da. Bogati su cisteinom (~30%) i metalnim jonima, pre svih  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{+}$  i  $Cd^{2+}$ . Metalotioneini imaju visoko konzervisan broj cisteinskih ostataka između kojih se uglavnom nalaze bazne amino-kiseline (lizin i arginin), dok histidin i aromatične amino-kiseline nikada ne ulaze u njihov sastav (Coyle i dr., 2002; Babula i dr., 2012; Kojima i dr., 1999).

Indukcija ekspresije *mtn* gena je metal-zavisna, a prisustvo regulatornih elemenata MRE (*engl.* metal response elements) uzvodno od *mtn* gena kod sisara, kao i postojanje transkripcionog faktora MTF-1 (*engl.* metal response element-binding transcription factor-1) koji se vezuje za MRE, predstavljaju potvrdu za to (Otsuka, 2004; Sakulsak, 2012). Osim kod sisara, geni za Mtn su dobro proučeni i kod 12 vrsta vinskih mušica čiji je genom sekvenciran. Utvrđeno je da postoji 5 gena za Mtn: *mtnA*, *mtnB*, *mtnC*, *mtnD* i *mtnE* (Atanesyan i dr., 2011). Svi se nalaze u istom genomskom regionu i najverovatnije su nastali duplikacijom. Dominantne izoforme metalotioneina su MtnA i MtnB, a ekspresija *mtn* gena zavisi od

transkripcionog faktora nazvanog Dmel/MTF-1, koji je homolog sisarskom MTF-1 (Perez-Rafael i dr., 2012).

Metalotioneini imaju brojne uloge u ćeliji (Slika 5). Učestvuju u zaštiti od teških metala (žive, kadmijuma), regulaciji homeostaze esencijalnih metala (bakra i cinka), zaštiti od oksidativnog stresa, regulaciji ćelijske deobe, diferencijaciji i kontroli ćelijske smrti (Capdevila i Atrian, 2011; Ruttkay-Nedecky i dr., 2013). Važna komponenta zaštite od oksidativnog stresa, jer imaju visok sadržaj sulfhidrilnih grupa koje direktno učestvuju u uklanjanju slobodno-radikalnih ili reaktivnih vrsta kiseonika i azota. Takođe, Mtn učestvuju i indirektno u antioksidativnoj zaštiti kontrolišući dostupnost prooksidativnih (bakar, gvožđe) ili antioksidativnih metalnih jona (cink) (Formigari i dr., 2008).



**Slika 5.** Raznovrsnost uloga metalotioneina u ćeliji. Prerađeno prema Ruttkay-Nedecky i dr., 2013.

Regulacija ćelijske smrti putem Mtn se ogleda u tome što Mtn mogu da deluju *direktno* – kao antiapoptotski proteini koji se vezuju za proapoptotske proteine (npr. p53) i inaktiviraju ih, ili *indirektno* – modulišući aktivnost transkripcionih faktora (npr. NF-κB, *engl.* nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) koji utiču na ekspresiju anti- i proapoptotskih proteina (Babula i dr., 2012).

### *Transferin i feritin*

U regulaciji prometa gvožđa učestvuje mnogo proteina, ali najznačajniji su transferin i feritin. Transferin (TF) je glikoprotein koji kontrolira nivo slobodnog gvožđa u biološkim tečnostima i služi kao njegov glavni transporter. Molekulska težina ovog proteina iznosi oko 80 kDa i kodiran je *tf* genom. Sadrži dva vezivna mesta sa izuzetno visokim afinitetom za jone  $Fe^{3+}$  koji se reverzibilno vezuju. Premda gvožđe vezano transferinom predstavlja samo mali deo ukupnog gvožđa, transferin je najvažnije skladište ovih jona u organizmu (Lee i dr., 2006).

Feritin (skraćeno Fer) je prvi put opisan 1937. godine od strane Laufbergera, koji ga je metodom kristalizacije izolovao iz kadmijumovih soli (Laufberger, 1937). Od tada, pored hemoglobina, feritin je verovatno najviše izučavan protein. Prisutan je kod bakterija, arhea, biljaka i životinja, ali nije pronađen kod kvasaca. Smatra se da je feritin verovatno najčešći i evolutivno najstariji molekul koji učestvuje u homeostazi gvožđa. Njegova glavna uloga je vezivanje i skladištenje gvožđa (Harrison i Arosio, 1996). Tipičan molekul feritina ima masu od 450 kDa i sastoji se od 24 subjedinice, savijene u strukturu od četiri  $\alpha$ -heliksa. Spajajući se, subjedinice formiraju gotovo sferičnu proteinsku "ljušturu" sa velikom šupljinom u koju može da se smesti do 4000 atoma gvožđa (Chasteen and Harrison, 1999). Trodimenzionalna struktura molekula je visoko očuvana kod prokariota i eukariota, iako je sličnost u sekvenci amino-kiselina veoma mala (15%). Kod viših eukariota, feritin se sastoji od dva tipa subjedinica: teških (H) i lakih (L), koje zajedno formiraju heteropolimere. Insekatski feritin ima verovatno najjednostavniji oblik i predstavlja heterodimer formiran od dve subjedinice (Andrews i dr., 1992; Hamburger i dr., 2005).

Feritin je u ćeliji prisutan u citoplazmi, jedru, mitohondrijama i vakuolama. Distribucija ovog proteina unutar ćelijskih odeljaka se razlikuje između kičmenjaka i insekata, kao i među samim insektima. Istraživanja su pokazala da većina insekatskih vrsta skladišti gvožđe unutar vakuolarnog feritina (Nichol i Locke, 1990), a izuzetak su vrste iz reda Homoptera, kod kojih je dokazano prisustvo citoplazmatskog i jedarnog holoferitina (Locke i Nichol, 1992). Poznato je da su



insekatski feritini sekretorni proteini i da cirkulišu kroz različita tkiva putem hemolimfnog sistema (Nichol i dr., 2002). Sisari, pored citoplazmatskog feritina, imaju mitohondrijski feritin, koji se sintetiše samo u nekim tkivima i verovatno ima funkciju u zaštiti od oksidativnog stresa i toksičnog dejstva gvožđa (Levi i dr., 2001). Geni za mitohondrijski feritin kod insekata se ekspresuju samo u testisima (Missirlis i dr., 2006).

Sve forme feritina reaguju *in vitro* sa gvožđem ( $\text{Fe}^{2+}$ ) i skladište ga unutar slobodnog prostora u feri-oksohidroksidnom jezgru (Harrison i Arosio, 1996). Smatra se da se ova reakcija odvija i u ćelijama i biološki je značajna iz dva razloga: prvo, veoma velik kapacitet za vezivanje gvožđa koncentruje ove jone u stabilnu i sigurnu formu koja se može koristiti po potrebi (tj. sprečava se gubitak dragocenog metala). Drugo, na ovaj način se onemogućava da  $\text{Fe}^{2+}$  učestvuje u reakcijama sličnim Fentonovoj reakciji, u kojima spontana oksidacija  $\text{Fe}^{2+}$  do  $\text{Fe}^{3+}$  donira jedan elektron koji pretvara neradikalske reaktivne vrste kiseonika slobodno-radikalske. Istraživanja su pokazala da se u reakciji preuzimanja gvožđa od strane feritina koristi  $\text{O}_2$  kao oksidant i da je za njeno odvijanje neophodno katalitičko mesto nazvano ferioksidazni centar (Levi i dr., 1988). Feroksidaznom aktivnošću nastaje intermedijer  $\text{H}_2\text{O}_2$ , koji odmah može reagovati sa  $\text{Fe}^{2+}$  (Zhao i dr., 2003). Sposobnost da koristi  $\text{O}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$  za oksidaciju gvožđa je odlika svih formi feritina, sem humanog mitohondrijskog feritina. Feritini se zbog toga smatraju značajnim inhibitorom produkcije slobodnih radikala, što objašnjava njihovu očuvanost i prisutnost u ćelijama skoro svih organizama. Iako *in vitro* feritin interaguje direktno sa jonima gvožđa, mehanizam preuzimanja gvožđa *in vivo* je složeniji i zahteva prisustvo proteina košaperona gvožđa (Shi i dr., 2008).

Poput strukture, regulacija ekspresije gena za feritin je visoko očuvana kod bakterija, biljaka i životinja. Glavni stimulusi koji regulišu ekspresiju jesu dostupnost gvožđa i odgovor na oksidativni stres (Theil, 2007). Kod bakterija i biljaka regulacija se odvija samo na transkripcionom nivou (Briat i dr., 1999), a kod sisara i na posttranskripcionom (translacionom) nivou i uključuje dobro definisan mehanizam citosolne regulacije genske ekspresije (Hentze i dr., 1996).

Informaciona RNK citoplazmatskog feritina sadrži specifične strukture na 5'-UTR i 3'-UTR (*engl.* untranslated region) krajevima koje su nazvane IRE (*engl.* Iron Responsive Element) i za koje se vezuju IRP1 i IRP2 (*engl.* Iron Responsive Protein). Formiranje IRP/IRE kompleksa na 5'-UTR kraju blokira vezivanje ribozoma i translaciju, a dovodi i do degradacije date iRNK. Sa druge strane, vezivanje IRP1 za IRE na 3'-UTR drugih iRNK štiti date iRNK od degradacije. Afinitet IRP za IRE se menja u prisustvu gvožđa i u zavisnosti od redoks statusa ćelije.

U prisustvu slobodnih katjona gvožđa formiraju se gvožđe-sumporni klasteri sa IRP1 proteinom i menja se njegova konformacija, nakon čega on gubi sposobnost vezivanja za IRE, dobija akonitaznu aktivnost (Walden i dr., 2006; Tong i dr., 2007) i može učestvovati u Krebsovom ciklusu. Za IRP2 karakteristično je da se u prisustvu slobodnog gvožđa indukuje njegova degradacija, koja je kiseonik-zavisna i ne uključuje formiranje Fe-S klastera. IRP2 je selektivniji u vezivanju za različite IRE strukture i glavni je regulator feritina *in vivo* (Meyron-Holtz i dr., 2004).

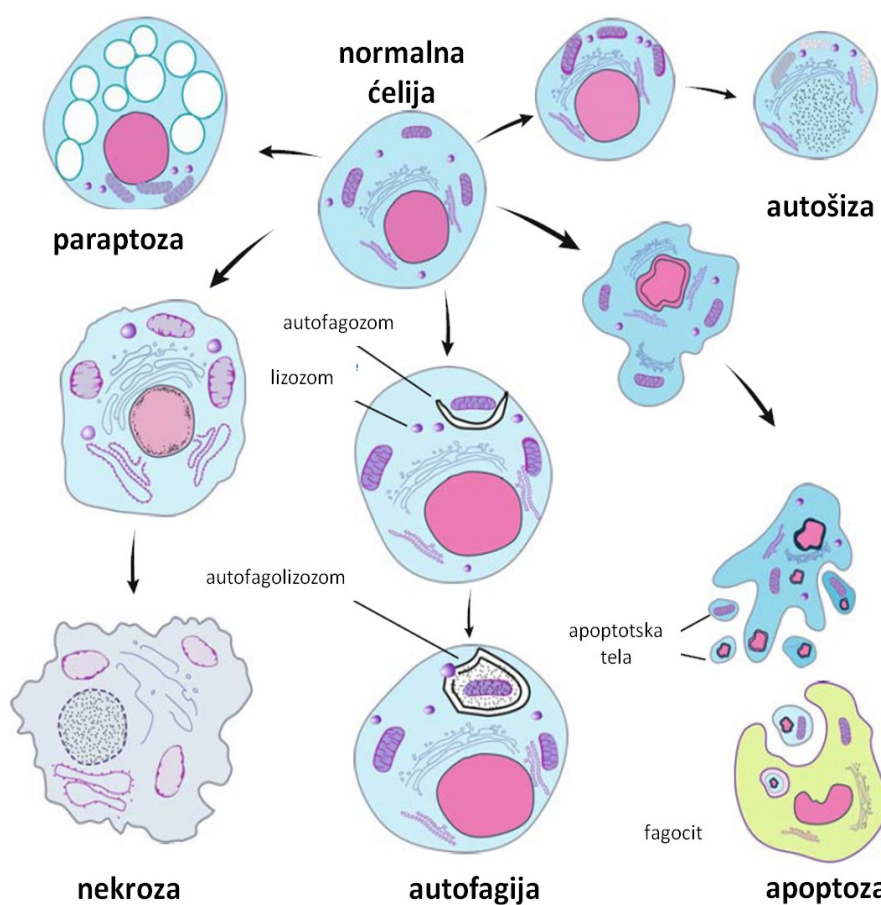
U prisustvu ROS i RNS narušavaju se Fe-S klasteri u IRP proteinima što dovodi do oslobađanja IRP1, vraćanja njegove prvobitne konformacije i sposobnosti za vezivanje za IRE na ciljnim iRNK.

Transkripciona regulacija feritina je manje proučavana, ali je jednako bitna kao i posttranskripciona. Na ovom nivou, sinteza feritina je kontrolisana širokim spektrom faktora: zapaljenjima, različitim hemijskim agensima i hormonima, solima gvožđa i hemom (Ai i Chau, 1999). Hem, kao potencijalni prooksidativni molekul, deluje na transkripcionom (vezivanjem Bach1 transkripcionog faktora, *engl.* BTB and CNC homology 1) i posttranskripcionom nivou (preko vezivanja IRP2), i veoma je jak stimulator ekspresije citoplazmatskog feritina (Hintze i dr., 2007).

## 1.5 Regulacija ćelijske smrti u uslovima hipometabolizma

Ćelijska smrt je predmet velikog interesovanja i brojnih istraživanja kako zbog njenog značaja u pravilnom razvoju organizma (embrionalnom i postembrionalnom), u održavanju homeostaze imunog sistema, tako i zbog povezanosti sa različitim patološkim stanjima – insulin-zavisnim dijabetesom, kancerom, brojnim autoimunim i neurodegenerativnim bolestima.

S obzirom na to da postoje različite forme ćelijske smrti, koje često imaju zajedničke signalne puteve, te da je poznato da inhibicija jednog puta vodi ka aktivaciji drugog, teško je napraviti jasno razgraničenje istih. Jedna, od velikog broja podela, data je u preglednom radu Saikumar i Venkatachalam (2009) gde su vrste ćelijske smrti klasifikovane na: apoptozu, nekrozu, autofagiju, paraptozu i autošizu (Slika 6).



**Slika 6.** Tipovi ćelijske smrti (preuzeto iz: Saikumar i Venkatachalam, 2009).

*Nekroza* nastaje kao posledica delovanja različitih slučajnih faktora – toksina, fizičkih stimulusa ili patoloških stanja, npr. ishemije. Tradicionalno, nekroza je posmatrana kao slučajna ćelijska smrt, mada noviji podaci svedoče suprotno – da se ona može javiti i kao programirana forma smrti (Golstein i Kroemer, 2007). Posledice klasične nekroze su bubrenje ćelije, narušavanje strukture kompleksa DNK-hromatin, narušavanje celovitosti ćelijske membrane i oslobađanje unutarćelijskog sadržaja u vanćelijski prostor, što dovodi do zapaljenja okolnog tkiva. Neke forme ćelijske smrti mogu imati mešovite morfološke osobine npr. aponekroza poseduje karakteristike i nekroze i apoptoze (Saikumar i Venkatachalam, 2009).

*Autofagija* je vrsta programirane ćelijske smrti koju karakteriše nastanak autofagnih vakuola (Slika 6), unutarćelijskih struktura sa dve ili više ovojnica u kojima se nalaze delovi citosola i organela, a koje se vremenom spajaju sa lizozomima u autofagolizosome, gde se razgrađuju fagocitirani delovi ćelije. Tačna uloga autofagije i dalje nije dobro razjašnjena, mada se zna da učestvuje u preživljavanju tokom gladovanja kada ćelije kao izvor „metaboličkog goriva“ koriste sopstvene unutrašnje izvore biomolekula. Za autofagiju se pretpostavlja da je, makar jednim delom, odgovorna za visoku otpornost ćelija kancera na gladovanje i hipoksiju (Saikumar i Venkatachalam, 2009).

Autofagija može imati ulogu i u razvoju organizama i održavanju tkivne homeostaze. Dobri primeri za to su razgradnja insekatskih međusegmentalnih mišića i svilenih žlezda, involucija mlečnih žlezda po prestanku laktacionog perioda i u menopauzi, kao i regresija prostate kod sisara (Lockshin i Zakeri, 2004).

*Paraptoza* je vid ćelijske smrti tokom koje dolazi do pojave povećane vakuolizacije citosola, što je posledično praćeno bubrenjem mitohondrija i endoplazmatskog retikuluma (Slika 6). Vakuolizacija citoplazme se dešava u velikom broju ćelijskih linija spontano ili pod uticajem različitih stimulusa, a vodi u ćelijsku smrt kada se postigne kritičan broj i veličina vakuola (Saikumar i Venkatachalam, 2009).

*Autošiza* je vrsta ćelijske smrti koja nastaje kao posledica delovanja povećanog oksidativnog stresa. Razlikuje se od apoptoze i nekroze po karakterističnoj redukciji citoplazme koja se raspoređuje u tanak sloj oko jedra (Slika 6). Mitohondrije se zajedno sa ostalim organelama kondenzuju oko jedra, kao posledica narušavanja strukture citoskeleta i smanjenja količine citosola. Za autošizu je svojstveno da uglavnom obuhvata grupu ćelija, mada se ponekad može javiti i u pojedinačnoj ćeliji (Saikumar i Venkatachalam, 2009).

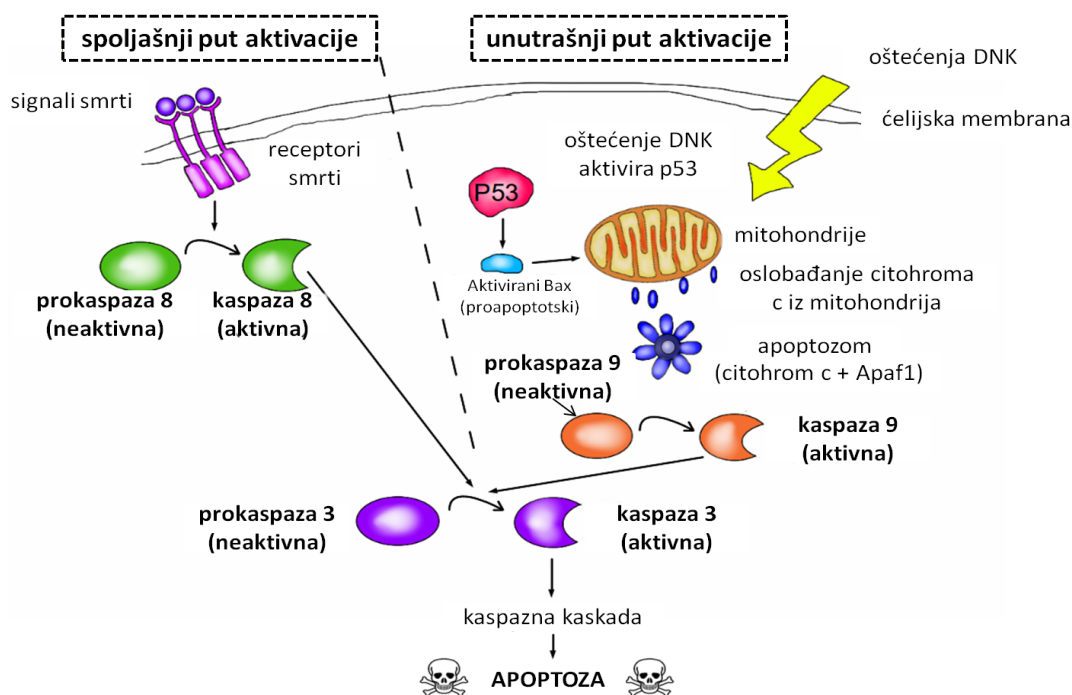
*Apoptoza* potiče od grčkih reči *ἀπό* (od) i *πτῶσις* (padati), koje zajedno znače otpadati. Naziv je dobila zbog specifične morfologije koja uključuje skupljanje sadržaja ćelije, jedra, hromatina, rasparčavanje ćelije u, membranom oivičena, apoptotska tela, kao i enzimom-posredovano sečenje DNK (Movassagh i Foo, 2008). Za razliku od nekroze, oštećenja membrane se javljaju kasno tokom apoptoze – nakon fagocitoze delova apoptotske ćelije od strane fagocita ili susednih ćelija, pri čemu odsustvuje ili se javlja blagi upalni proces. U širem kontekstu termin „apoptoza“ se upotrebljava kao sinonim za programiranu ćelijsku smrt (Alberts i dr., 2002).

### 1.5.1 Mehanizmi apoptoze

Apoptoza se može podeliti u tri uzastopna koraka: (1) korak obavezivanja (*engl. commitment phase*) u kome ćelijska smrt biva započeta specifičnim spoljašnjim ili unutrašnjim ćelijskim signalima; (2) korak izvršavanja apoptoze i (3) korak uklanjanja ostataka apoptotske ćelije fagocitozom od strane okolnih ćelija ili ćelija imunog sistema.

Mehanizmi apoptoze predstavljaju niz energetski-zavisnih i složenih događaja. Postoje dva glavna puta pokretanja apoptoze (Slika 7): spoljašnji (put preko receptora smrti) i unutrašnji put (Movassagh i Foo, 2008). Postoji i treći put pokretanja apoptoze, a koji predstavlja deo imunog odgovora u ćelijskoj smrti posredovanoj citotoksičnim T-ćelijama.

Sva tri puta vode ka istom – aktivaciji izvršnih kaspaza -3 ili -7 koje razlažu unutarćelijske protein i aktiviraju fragmentaciju jedarne DNK što vodi nastanku apoptotskih tela i fagocitozi (Alberts i dr., 2002).



**Slika 7.** Unutrašnji i spoljašnji put otpočinjanja apoptoze (Internet 2).

### Spoljašnji put aktivacije

*Spoljašnji put apoptoze* aktivira se preko receptora smrti (*engl.* death receptors, DR) koji se nalaze na površini ćelije. Vezivanje liganada za ove receptore aktivira inicijatorsku kaspazu 8 koja posleđično aktivira izvršnu kaspazu 3 (Slika 7). Receptori kojima se aktivira apoptoza pripadaju familiji receptora za TNF proteine (*engl.* tumor necrosis factor).

Unutarćelijski delovi DR receptora imaju specifičan tzv. domen smrti, cisteinom-bogat DD domen (*engl.* death domen), koji igra važnu ulogu u sprovođenju informacije sa površine ćelije do unutarćelijskih signalnih molekula. Nakon vezivanja liganada za DR receptor smrti, receptor se trimerizuje u kompleks i preko DD domena interaguje sa adaptivnim proteinima (Elmore, 2007). Potom, dolazi do nastanka DISC kompleksa (*engl.* death-inducing signaling complex), privlačenja i

oligomerizacije prokaspaze 8, koja se samoiseca i prevodi u aktivni oblik. Aktivirana kaspaza 8 iseca prokaspazu 3 i prevodi je u izvršni oblik – kaspazu 3. Spoljašnji put aktivacije je naročito važan u imunom odgovoru, jer T-ćelije i aktivni makrofagi proizvode TNF $\alpha$  u odgovoru na infekciju (Saikumar i Venkatachalam, 2009).

Kao jedna vrsta zaštite od nesvrshodnog pokretanja apoptoze i kao vid dvostruke provere (*engl.* double-check control), u mnogim ćelijama je za aktivaciju kaspaze 3 posredstvom kaspaze 8 neophodno i postojanje mitohondrijske pozitivne sprege koja se karakteriše otpuštanjem proapoptotskih mitohondrijskih proteina (Alberts i dr, 2002; Movassagh i Foo, 2008).

#### *Unutrašnji putevi aktivacije*

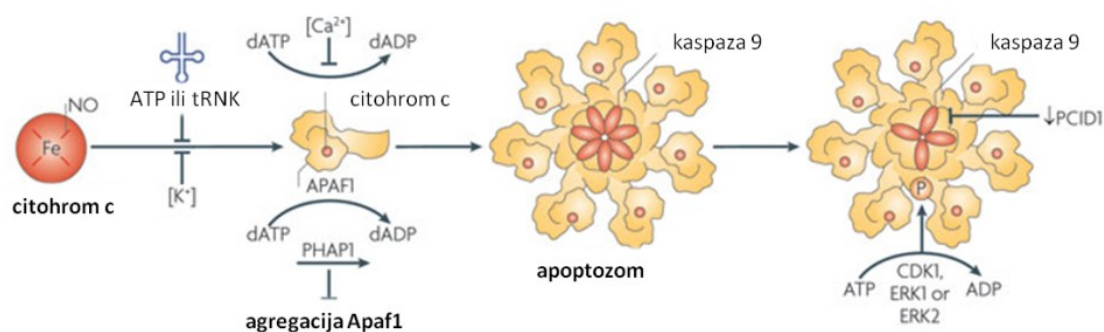
Na različite unutrašnje poremećaje ćelije mogu odgovoriti aktivacijom apoptoze. Ksenobiotici, lekovi, toplota, hladnoća, radijacija, hipoksija, infekcije patogenima i oštećenja DNK predstavljaju neke od stimulusa koji mogu aktivirati unutrašnji put apoptoze. Ipak, aktivacija ćelijske smrti nije jednostavna i predstavlja posledicu međusobne interakcije mehanizama koji stimulišu odnosno sprečavaju apoptozu.

Smatra se da su intenzitet i dužina trajanja određenog nadražaja, bilo inhibirajućeg ili aktivirajućeg, najvažniji parametri koji određuju da li će kaskada kaspaza biti pokrenuta. Iako su mehanizmi aktivacije apoptoze često karakteristični za svaki nadražaj, ipak postoje neke zajedničke karakteristike. Na primer, zna se da nadražaji koji oštećuju DNK – jonizujuće zračenje, ksenobiotici i slično, najčešće vode ka p53-posredovanoj aktivaciji apoptoze (Saikumar i Venkatachalam, 2009).

Takođe, poznato je da većina stresnih nadražaja menja propustljivost spoljašnje membrane mitohondrija (MOMP, od *engl.* mitochondrial outer membrane permeabilization) i oslobađa iz međumembranskog prostora u citosol proapoptotske proteine – citohrom *c*, Smac/DIABLO (*engl.* second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI) i serin proteaze. Potom, citohrom *c* sa prokaspazom 9, preko proteina Apaf1 (*engl.*

apoptotic protease activating factor 1), formira kompleks, poznatiji kao „apoptozom” (Slika 8).

Istovremeno, drugi proteini oslobođeni iz međumembranskog prostora mitohondrija (Smac/DIABLO i serin proteaze) smanjuju aktivnost proteina inhibitora apoptoze (IAP, *engl.* inhibitor of apoptosis). Kao posledica navedenih događaja, iseca se prokaspaza 9 i prevodi u kaspazu 9, koja dalje aktivira izvršnu kaspazu 3 (Elmore, 2007).



**Slika 8.** Uspostavljanje apoptozoma. Prerađeno prema Tait i Green, 2010.

Osim mitohondrija, unutrašnji put aktivacije apoptoze može biti posredovan stresom endoplazmatskog retikuluma (ER). Pod pojmom stresa ER podrazumevaju se pre svega događaji koji dovode do smanjenog kapaciteta za savijanje novosintetisanih proteina kada dolazi do njihovog nakupljanja, grupisanja i aktivacije odgovora nesavijenih proteina (*engl.* unfolded protein response, UPR). Najčešći inicijatori ER puta su promene u energetske statusu ćelija – u odnosu ADP/ATP i AMP/ATP (za više informacija pogledati poglavlje 1.5.4 *Regulacija ćelijske smrti tokom gladovanja i produženog hipometabolizma*), promene redoks stanja ćelije i povećanje citoplazmatskog Ca<sup>2+</sup> (Szegezdi i dr., 2006).

Poznato je da ER može učestvovati u inicijaciji apoptoze ili preko UPR ili putem kalcijum-zavisnog signalinga (Movassagh i Foo, 2008). S obzirom na to da se kalcijum iz citoplazme aktivno upumpava u endoplazmatski retikulum pomoću SERCA – sarkoplazmatske/endoplazmatske Ca<sup>2+</sup>-ATPaze (*engl.* sarco/endoplasmic



reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase), a u citoplazme se vraća preko receptora za inozitol-1,4,5-trifosfat ( $\text{InsP}_3\text{R}$ ) ili rijanodinskog receptora, brojni ćelijski procesi, među kojima je i apoptoza, osetljivi su na promene koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  u citoplazmi. Prisustvo Bcl-2 proteina (*engl.* B-cell lymphoma), kao npr. Bax proteina (*engl.* Bcl-2-associated X protein) na površini membrane ER može dovesti do formiranja pora kroz koje  $\text{Ca}^{2+}$  može izlaziti u citoplazmu u pravcu svog gradijenta. Povećanje koncentracije kalcijuma u citoplazmi vodi ka otvaranju MPTP pora (*engl.* mitochondrial permeability transition pore) na spoljašnjoj membrani mitohondrija i do oslobađanja proapoptotskih proteina iz međumembranskog prostora (Movassagh i Foo, 2008).

Glavni medijator ER posredovane apoptoze je kaspaza 12 koja se aktivira preko UPR odgovora, kalpainom i povećanjem nivoa  $\text{Ca}^{2+}$  u citoplazmi. Jednom aktivirana, kaspaza 12 prelazi u citoplazmu i bez formiranja apoptozoma aktivira kaspazu 9 koja otpočinje unutrašnji put apoptoze, ali nezavisno od mitohondrija (Rascheva i Domingos, 2009).

### *Regulacija apoptoze posredstvom različitih proteinskih familija*

#### Bcl-2 familija proteina

Kontrola i regulacija mitohondrijskih događaja uključenih u apoptozu posredovana je aktivnošću članova Bcl-2 familije proteina (Alberts i dr., 2002). Proteini ove familije imaju domene homologe Bcl-2 (BH domene): BH1, BH2, BH3 i BH4. Ovoj familiji pripadaju i pro- (Bax, Bak, Bad, Bid i dr.) i antiapoptotski (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w i dr.) proteini od čijeg odnosa zavisi osetljivost ćelije na različite apoptotske stimulse (Elmore, 2007).

Kada se ćelija izloži proapoptotskim stimulusima, dolazi do migracije citoplazmatskog Bax proteina (*engl.* Bcl-2-associated X protein) na spoljašnju mitohondrijsku membranu, gde se Bax udružuje u kompleks sa Bak proteinom (*engl.* Bcl-2 homologous antagonist/killer), drugim proapoptotskim proteinom iz Bcl-2 familije. Dalje, novonastali Bax-Bak kompleks, na spoljašnjoj mitohondrijskoj membrani, uspostavlja otvore kroz koje se iz međumembranskog prostora u

citosol oslobađaju citohrom *c* i drugi proapoptotski mitohondrijski proteini (Saikumar i Venkatachalam, 2009).

#### IAP familija proteina

U negativnu kontrolu apoptoze uključeni su i članovi IAP familije proteina, od *engl.* apoptosis-inhibitory protein (Alberts i dr., 2002). Proteini IAP familije su prvo opisani kod bakulovirusa, a potom kod vinske mušice (Saikumar i Venkatachalam, 2009). Odlikuju se prisustvom BIR domena (*engl.* baculoviral IAP repeat) preko koga se povezuju sa ciljnim proteinima. Za funkcionalnost IAP proteina neophodno je postojanje najmanje jednog BIR domena, dugog oko 70 amino-kiselina, dok ih najviše može biti tri. Osim BIR domena, IAP proteini mogu imati i druge domene - RING (od *engl.* really interesting new gene), CARD (*engl.* the caspase activation and recruitment domain) i dr.

U spoljašnjem putu apoptoze, IAP proteini se ne vezuju direktno za kaspazu 8 već za njen supstrat, čime posredno regulišu njenu aktivnost. Nasuprot tome, u unutrašnjem putu aktivacije IAP se direktno vezuju za prokaspazu 9, čime sprečavaju njenu aktivaciju i pokretanje apoptoze (Deveraux i Reed, 1999).

Aktivnost IAP proteina je regulisana proteinima koji sadrže IAP-vezujući tetrapeptidni motiv, a među njima su najpoznatiji Smac/DIABLO proteini, koji se iz međumembranskog prostora mitohondrija oslobađaju u citosol, vezuju za IAP proteine i pomažu aktivaciju apoptoze (Saikumar i Venkatachalam, 2009).

#### Proteini toplotnog stresa (HSP)

Proteini toplotnog stresa (HSP) takođe mogu dvojako učestvovati u regulaciju ćelijske smrti – kao aktivatori ili inhibitori. HSP, kao šaperoni, učestvuju u sintezi i savijanju nascentnih proteina, degradaciji i translokaciji proteina, a mogu posredno i neposredno uticati na regulaciju apoptoze (Takayama i dr., 2003). HSP mogu regulisati stresom izazvano oslobađanje citohroma *c* iz međumembranskog prostora mitohondrija, uspostavljanje apoptozoma i otpočinjanje apoptoze. Takođe, mogu uticati i na signalne puteve koji se aktiviraju preko receptora smrti (Beere, 2004).

## 1.5.2 Kaspaze – izvršni proteini apoptoze

Kaspaze su proteolitički enzimi koji se prema klasifikaciji Internacionalne unije za biohemiju i molekularnu biologiju svrstavaju u grupu cistein proteaza (EC 3.4.22.X). Centralna uloga kaspaza u apoptozi je utvrđena opažanjem da apoptoza, i sve klasične promene vezane za apoptozu, mogu biti sprečene ukidanjem aktivnosti kaspaza (Alberts i dr., 2002). Postepena aktivacija kaspaza ima centralnu ulogu u apoptozi i vodi ka isecanju citosolnih i jedarnih proteina koji učestvuju u ćelijskoj deobi, održavanju citoskeleta, DNK replikaciji i reparaciji, degradaciji RNK i drugim ćelijskim procesima. Na ovaj način nastaju morfološke promene karakteristične za apoptozu. Jednom pokrenuta kaskada kaspaza nepovratno vodi ćeliju u smrt (Saikumar i Venkatachalam, 2009).

Kaspaze se, prema svojoj strukturi i funkciji, dele na:

- *inicijatorske*, u koje spadaju sisarske kaspaze 2, 8, 9 i 10 i kaspaze vinske mušice Dronc i Dredd, i
- *izvršne (efektorne)* kaspaze, koje obuhvataju sisarske kaspaze 3, 6 i 7 i kaspaze vinske mušice – drICE, Decay, Damm, Dcp1 i Strica (Riedl i Shi, 2004).

*Inicijatorske kaspaze* sadrže dugačak N-terminalni prodomen i jedan od dva karakteristična motiva neophodna za protein-protein interakcije – DED domen (*engl.* death effector domain) i/ili CARD domen (*engl.* the caspase activation and recruitment domain) (Saikumar i Venkatachalam, 2009). Inicijatorske kaspaze su inertni monomeri koji zahtevaju dimerizaciju kako bi došlo do samoaktivacije. Dimerizacija enzima je olakšana regrutovanjem kaspaze u oligomerni kompleks, npr. apoptozom, koji se formira u odgovoru na apoptotski signal (Pop i Salvesen, 2009).

Za razliku od inicijatorskih kaspaza koje su sposobne za autokatalitičku aktivaciju, izvršne prokaspaze za aktivaciju zahtevaju proteolizu na mestu aspartatnih rezidua pomoću inicijatorskih kaspaza, pri čemu nastaju mala i velika subjedinica (Riedl i Shi, 2004).

### *Sisarske kaspaze*

Do sada je identifikovano ukupno 12 sisarskih kaspaza koje su razvrstane u *inicijatorske* (kaspaze 2, 8, 9, 10), *izvršne* (kaspaze 3, 6, 7) i *inflamatorne* kaspaze (kaspaze 1, 4, 5) (Saikumar i Venkatachalam, 2009).

*Kaspaza 9* igra ključnu ulogu u apoptozi posredovanoj unutarćelijskim nadražajima, jer seče prokaspazu 3 i prevodi je u aktivnu formu (Kumar, 2007).

*Kaspaza 8* je inicijatorska kaspaza spoljašnjeg puta neophodna za pravilan razvoj organizma i aktivirana je preko membranskih receptora smrti. *Kaspaza 8* seče prokaspazu 3 i prevodi je u aktivnu formu (Kumar, 2007).

*Kaspaza 3* je glavna izvršna kaspaza koja je aktivirana posredstvom inicijatorskih kaspaza 8 i 9. Kao izvršni enzim neophodna je za formiranje apoptotskih tela, kondenzaciju hromatina i fragmentaciju DNK u mnogim tipovima ćelija (Saikumar i Venkatachalam, 2009).

### *Insekatske kaspaze*

Kod vinske mušice otkriveno je sedam kaspaza, koje su nazvane Dcp-1, Dredd, drICE, Dronc, Decay, Damm i Strica/Dream (Kumar, 2007). Kao i kaspaze sisara, insekatske kaspaze se na osnovu strukture prodomena dele na inicijatorske i izvršne. Inicijatorske kaspaze Dredd, Dronc i Strica sadrže dug aminoterminalni prodomen, dok izvršne kaspaze Dcp-1, drICE, Decay i Damm imaju kratke prodomene.

*Dronc* je primarna inicijatorska kaspaza kod vinske mušice i kao takva često se smatra ortologom kaspaze 9, iako je prema sekvenci najbližnja humanoj kaspazi 2. Prisutna je u svim ćelijama vinske mušice i njena transkripcija je osetljiva na steroidni hormon ecdizon, koji pokreće histolizu larvalnog tkiva tokom preobražaja. *In vivo* i *in vitro* studije su pokazale da je Dronc kaspaza ključna za apoptozu kako tokom razvoja i preobražaja larvalnih tkiva tako i u odgovoru na  $x$ - i  $\gamma$ -zračenje. Dronc je jedina kaspaza kod *D. melanogaster* koja sadrži CARD domen

(Kumar, 2007). Jedini, za sada poznati, supstrati za Dronc su efektorne kaspaze drICE i Dcp-1, i IAP protein, DIAP1 (Cooper i dr., 2009).

*Dredd* je kaspaza koja sadrži domen „smrti“ i deli umerenu sličnost sa sisarskom kaspazom 8. Dugački prodomen *Dredd* se sastoji iz dva DED domena koji interaguju sa adapterom kaspaza, dFADD (*engl. Drosophila* Fas associated death domain containing protein). Za *Dredd* se prvobitno mislilo da je inicijator apoptoze koji funkcioniše nizvodno od Rpr (*engl. reaper*), ali su istraživanja pokazala da je njena primarna uloga u urođenom imunom odgovoru (Kumar, 2007).

Dronc i *Dredd* učestvuju i u brojnim neapoptotskim procesima kao što su proliferacija ćelija, individualizacija spermatida i kretanje ćelija. Sa druge strane, funkcija *Strica*, sa dugačkim serin- i treonin-bogatim prodomenom sličnim inicijatorskim kaspazama, nije razjašnjena, niti domeni slični *Strica* postoje kod sisara (Kumar, 2007; Cooper i dr., 2009).

Izvršne kaspaze *Drosophila*, Dcp i drICE su međusobno veoma slične, i zajedno sa Decay, dele veliku homologiju sa sisarskom kaspazom 3 (Kumar, 2007).

DRICE/drICE je najprisutnija kaspaza u tkivima vinske mušice. Ona je primarni supstrat Dronc kaspaze. Ima kratak prodomen, najbližnja je sisarskoj kaspazi 3 i pokazuje istu specifičnost prema supstratu za DEVD (Asp-Glu-Val-Asp) sekvencu. Njena aktivnost se indukuje i ekdizonom, nizvodno od aktivatora ćelijske smrti Reaper i Hid, i neophodna je za ćelijsku smrt tokom razvoja organizma (Kumar, 2007).

*Dcp-1* i *Decay* su slične drICE, imaju kratak prodomen i specifičnost za prepoznavanje sekvence DEVD. Veliki broj podataka ukazuje da se ćelijska smrt normalno odvija kod *decay* mutanata, te da ova kaspaza nije neophodna tokom razvoja i da verovatno ima drugu ulogu (Cooper i dr., 2009).

Apoptoza je kod *D. melanogaster* primarno regulisana Dronc kaspazom, homologom kaspaze 9. U mnogim ćelijama dolazi do spontane aktivacije ovog enzima i ćelije preživljavaju tako što sintetišu IAP protein 1 (DIAP1). DIAP1 inhibiše Dronc, tako što promoviše ubikvitinaciju i degradaciju ove kaspaze

(Feinstein-Rotkopf i Arama, 2009). Pored toga, ekspresija proapoptotskih RGH proteina (od *engl.* Reaper, Grim and Hid) ometa interakciju DIAP1 i kaspaze, što dovodi do aktivacije kaspazne kaskade. Zbog toga, ćelijska smrt kod *Drosophila* je rezultat serije kompleksnih interakcija između RGH proteina, DIAP1 i Dronc (Cooper i dr., 2009). Postoji vrlo malo podataka o molekulskoj osnovi apoptoze kod vrsta iz reda Lepidoptera. Prva opisana kaspaza Lepidoptera je izvršna Sf-kaspaza 1 kod vrste *Spodoptera frugiperda*. Ubrzo potom opisani su i ortolozi Sf-kaspaze 1 kod drugih vrsta – *Spodoptera littoralis*, *Helicoverpa armigera* i *Trichoplusia ni* (Courtiade i dr., 2011).

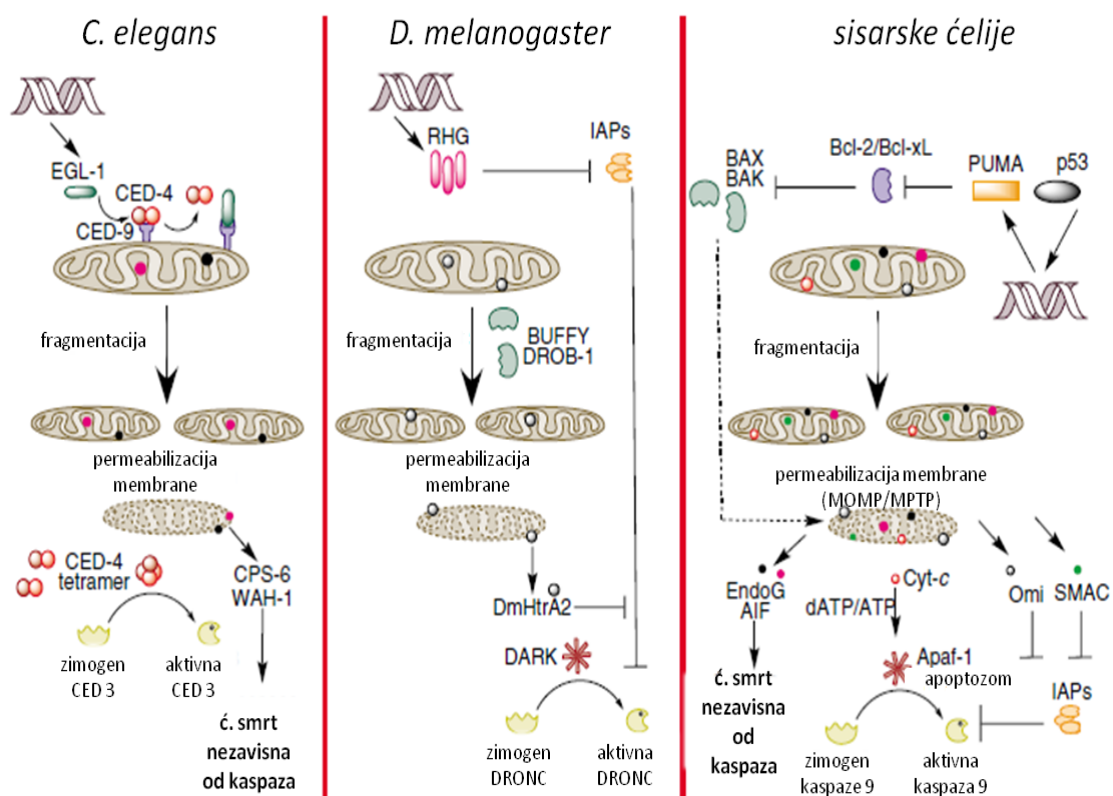
Nakon mapiranja genoma svilene bube *Bombyx mori*, jedine vrste predstavnika Lepidoptera čiji genom je potpuno sekvenciran, identifikovani su geni za kaspaze. Uočeno je 5 gena – za kaspazu 3 (na hromozomu 4), za kaspaze 1, 5 i 6 (na različitim delovima hromozoma 10) i za kaspazu 4 (na hromozomu 20). Korišćenjem EST markera (*engl.* expressed sequence tag), pronađeno je 63 gena za kaspaze kod 27 različitih vrsta Lepidoptera (Courtiade i dr., 2011).

Filogenetskim analizama je utvrđeno da su Lep-kaspaze 5 i 6 ortolozi kaspaze Dronc i Dredd kod Diptera, a Lep-Kaspaza 6 je filogenetski bliska sa Dredd kaspazom *Drosophila spp.* Lep-Kaspaza 5 sadrži CARD domen, slično kao Dronc vinske mušice i humana kaspaza 9, dok Lep-Kaspaza 6 ima karakterističnu strukturu specifičnu za familiju domena „smrti“, što podržava njeno svrstavanje u inicijatorske kaspaze (Courtiade i dr., 2011). Lep-Kaspaze 1 i 3 su srodne sa kaspazama Dcp-1, drICE i Decay i svrstavaju se u izvršne s obzirom na to da imaju kratak prodomen, visoku specifičnost ka tetrapeptidu DEVD i sposobnost da seku PARP (*engl.* Poly (ADP-ribose) polymerase) i/ili p35 (Courtiade i dr., 2011).

Iako sadrži umereno dug prodomen, Lep-Kaspaza 4 ne sadrži nijedan od poznatih Death domena, zbog čega se ne može svrstati među inicijatorske kaspaze. Filogenetske analize pokazale su da postoji sličnost ove kaspaze sa kaspazama vinske mušice – Damm i Strica, čija funkcija nije jasna (Courtiade i dr., 2011). Kod Lepidoptera su, slično kao kod Diptera, pronađene brojne apoptotski neaktivne kaspaze za koje se pretpostavlja da učestvuju u drugim procesima.

### 1.5.3 Evolutivna očuvanost osnovnih mehanizama apoptoze

Iako putevi ćelijske smrti nisu opisani kod mnogih organizama, na osnovu saznanja dobijenih od proučenih organizama, uočeno je da je osnovna organizacija puteva apoptoze u velikoj meri evolutivno očuvana i slična kod valjkastih crva, insekata i sisara (Slika 9).



**Slika 9.** Uporedni prikaz apoptotskih puteva u ćelijama *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* i sisara. Prerađeno prema Hand i Menze, 2008.

Osim kod vinske mušice (*D. melanogaster*), tradicionalnog model organizma za insekte, apoptoza kod drugih insekata (pa i zglavkara) slabo je proučena, iako su molekuli i mehanizmi koji učestvuju u inicijaciji, odvijanju i regulaciji unutrašnjeg puta ćelijske smrti kod određenih insekata poznati.

Postoje brojni razlozi zbog kojih bi istraživanja regulacije ćelijske smrti kod insekata iz različitih redova trebalo da se intenziviraju. Prvo, insekti su stari i raznovrsni organizmi koji mogu dati uvid u evoluciju apoptotske mašinerije, puteva apoptoze, regulaciju preobražaja i dr. Drugo, bolje poznavanje mehanizama ćelijske smrti može dovesti do primene znanja u dizajnu boljih ili novih načina kontrole poljoprivrednih štetočina, ali i očuvanju korisnih insekatskih vrsta.

Za svoju aktivaciju Dronc kaspaza vinske mušice zahteva formiranje apoptozoma, ali se formiranje kompleksa odvija nezavisno od prisustva citohroma *c* (Courtiade i dr., 2011). Regulatori aktivnosti kaspaza i kod sisara i kod insekata su IAP proteini koji inhibišu aktivnost kako inicijatorskih, tako i izvršnih kaspaza. Za kontrolu IAP proteina kod sisara su odgovorni Smac/Diablo proteini, odnosno RHG (*engl.* Reaper, Hid i Grim) – proteini „ubice“ kod vinske mušice. RHG se vezuju za DIAP1 (od *Drosophila* IAP1), stimulišu njegovu autoubikvitinaciju i degradaciju čime uklanjaju inhibiciju kaspaza (Purves i dr., 2009).

Kod insekata, enzimi slični inicijatorskoj kaspazi, kaspazi 9, aktiviraju se pod uticajem steroidnih hormona, pre svih ekdizona. Ekdizon igra važnu ulogu u programiranoj ćelijskoj smrti tokom razvoja insekata, jer aktivira kaspaze koje učestvuju, u ovom slučaju, više u procesu autofagije nego apoptoze (Martin i Baehrecke, 2004). Do sada, kod insekata, nije otkriven tip ćelijske smrti aktiviran membranskim receptorima, koji bi bio homolog spoljašnjem putu apoptoze sisara (Purves i dr., 2009). Homolog kaspazi 8 kod vinske mušice je Dredd, i on je učesnik nizvodnog dela kaskadnog puta u odgovoru na infekciju Gram-negativnim bakterijama. Ovaj enzim aktivira transkripcioni faktor Relish, koji se premešta u jedro i stimuliše transkripciju antimikrobnih peptida, dok njegovo učešće u apoptotskim procesima nije tačno utvrđeno (Leulier i dr., 2000).



### **1.5.4 Regulacija ćelijske smrti tokom gladovanja i produženog hipometabolizma**

Živi organizmi se u prirodi često susreću sa dugim periodima gladovanja, a dostupnost hrane je jedan od najvažnijih faktora koji utiče na rasprostranjenje vrste i kolonizaciju novih ekoloških niša. Od najjednostavnijih jednoćelijskih organizama do sisara količina nutrijenata određuje vreme razmnožavanja, aktivnog rasta i razvoja ili pak ulazak u dormanciju. Čovekov organizam takođe može biti izložen gladovanju usled nedostatka hrane, svesnog odricanja (dijete) od hrane, usled noćnog posta tokom spavanja i brojnih patoloških i drugih stanja.

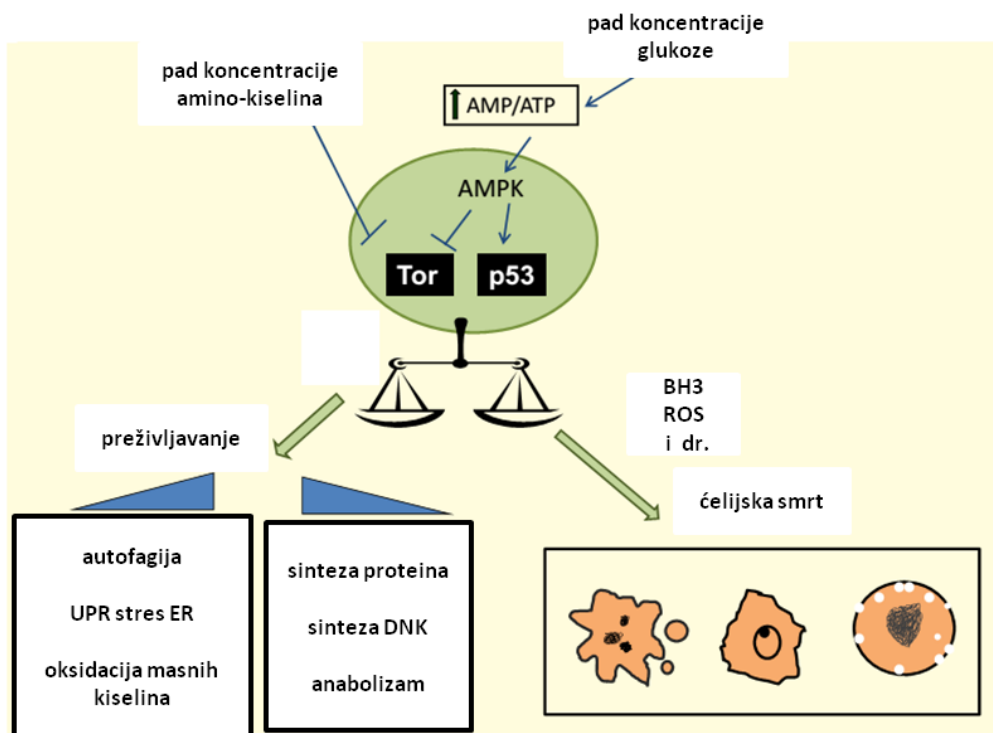
Kod višećelijskih organizama gladovanje se može manifestovati kako na nivou celog organizma (osećaj gladi), tako i na nivou tkiva i ćelija. Postoje različite forme gladovanja, dok ishemija predstavlja jednu od najrigoroznijih s obzirom na to da su u takvim uslovima tkiva i ćelije istovremeno izloženi nedostatku i nutrijenata i kiseonika. Ćelije u središtu čvrstih tumorskih masa su često pod ishemijom, jer je rast tumorske mase brži u odnosu na njenu prokrvljenost (Caro-Maldonado i Munoz-Pinedo, 2011).

Na ćelijskom nivou nedostatak različitih hranljivih materija izaziva različite odgovore, s obzirom na to da tkiva mogu da preferiraju određene nutrijente. Unutar ćelija gladovanje izaziva najpre aktivaciju unutrašnjih energetske rezervi i smanjenje aktivnosti metaboličkih puteva koji troše velike količine energije. Ipak, u nekim situacijama ćelije nisu sposobne da se prilagode na novonastali metabolički i energetski stres, što ih vodi ka apoptozi ili nekrozi. Mnoge ćelije ljudskog organizma, u uslovima nedostatka određenih nutrijenata, ulaze u apoptozu. Nejasno je zašto se u takvim uslovima u datim ćelijama aktivira apoptoza, umesto da se zaustavi deoba, smanji metabolička aktivnosti i ćelije uđu u neku formu mirovanja do povratka povoljnijih uslova (Caro-Maldonado i Munoz-Pinedo, 2011).

Da bi mogle obavljati svoje funkcije, ćelijama su neophodne osnovne hranljive materije – lipidi, amino-kiseline, nukleotidi i šećeri. Ćelije na različite načine prate količinu dostupnog kiseonika, glukoze, lipida, amino-kiselina i nukleotida, a samim

tim i na različite načine odgovaraju na njihov nedostatak. Gladovanje na ćelijskom nivou se može definisati kao nedostatak bilo kog nutrijenta koji je ćeliji neophodan u datom trenutku za obavljanje određene funkcije.

S obzirom na to da ćelije moraju da održavaju ekvilibrijum između anaboličkih i kataboličkih procesa, one konstantno kontrolišu svoj energetske status praćenjem koncentracije ATP-a i određenih amino-kiselina (Slika 10). Bilo koja promena koja vodi ka smanjenju koncentracije ATP-a naziva se energetske stres, koji ne mora uvek biti povezan sa gladovanjem ili nedostatkom kiseonika (Caro-Maldonado i Munoz-Pinedo, 2011).



**Slika 10.** Nedostatak hranljivih materija izaziva ili aktivaciju mehanizama za preživljavanje ili ćelijsku smrt. Prerađeno prema Caro-Maldonado i Munoz-Pinedo, 2011.

Nedostatak glukoze ili nekih drugih nutrijenata neophodnih za održavanje koncentracije ATP nukleotida najčešće vodi ka aktivaciji AMPK (*engl.* AMP activated protein kinase). AMPK je trimerni proteinski kompleks sa kinaznom aktivnošću, koga alosterno moduliše AMP. Sisarska AMPK je veoma osetljiva na

promene AMP/ATP odnosa, koji predstavlja dobar indikator energetske statusa (Slika 10). Aktivacijom AMPK, ćelija podstiče procese kao što su transport glukoze, uklanja glukozom-regulisanu supresiju gena i smanjuje ekspresiju gena uključenih u skupe biosintetske puteve. Takođe, nizak nivo ATP-a i aktivacija AMPK dovode do povećane sinteze i aktivacije p53 i p27, poznatih inhibitora ćelijske deobe (Nicoptera i Melino, 2004; Hardie, 2007; Pelicano i dr., 2006).

Drugi važan ćelijski senzor za održavanje energetske homeostaze je TORC1 (*engl.* target of rapamycin). Kod sisara TORC1 je multiproteinski kompleks koji sadrži mTOR (*engl.* Mammalian target of rapamycin) koji značajno podstiče sintezu proteina u ćelijama koje se aktivno i često dele. Brojni hormoni i faktori rasta aktiviraju mTOR, ali njegovu aktivnost mogu modulirati i pojedine unutarćelijske amino-kiseline. Iako se ne znaju tačni mehanizmi kojima amino-kiseline modulišu aktivnost mTOR, kao ni da li to čine direktno ili indirektno, zna se da nedostatak glutamina i leucina sigurno rezultira inhibicijom mTOR proteina. S obzirom na to da mTORC1 direktno fosforiliše proteine koji modulišu translacionu mašineriju, inhibicija mTORC1 dovodi do prestanka sinteze proteina. Takođe, inhibicija mTOR dovodi do zaustavljanja deobe ćelija preko smanjenja aktivnosti ciklina cdc2 (*engl.* cyclin-dependent kinase), ali isto dovodi do pojave autofagije, putem koje ćelija uzima neophodne nutrijente iz sopstvenih unutrašnjih rezervi. Aktivacija AMPK takođe može da inaktivira mTOR, iako indirektno. Na ovaj način i pad koncentracije ATP-a utiče na sintezu proteina i zaustavljanje ćelijske deobe (Wang i Proud, 2009).

Mnoge studije su pokazale da ćelije u nedostatku glukoze podležu apoptozi preko mitohondrijskog puta aktivacije. Nizak nivo glukoze dovodi do translokacije Bax proteina do spoljašnje mitohondrijske membrane što izaziva formiranje pora, pad potencijala između membrana mitohondrija, otpuštanje proapoptotskih faktora iz međumembranskog prostora i aktivaciju apoptoze preko kaspaze 9. Inhibicija apoptoze uzrokovane nedostatkom glukoze može se postići preko pojedinih antiapoptotskih Bcl proteina (Vander Heiden i dr., 2001; Gonin-Giraud i dr., 2002).

Unutrašnji put aktivacije apoptoze regulisan je preko Bcl-2 antiapoptotskih proteina sa BH3 domenom, među kojima je i Bad protein koji je u tesnoj vezi sa metabolizmom glukoze i apoptozom izazvanom njenim nedostatkom. Bad protein (*engl.* Bcl-2-associated death promoter) je u mitohondrijama prisutan u kompleksu sa glukokinazom (heksokinaza IV), najvažnijim regulatornim enzimom glikolize tokom koje nastaju intermedijeri za sintezu ATP-a. Pri nedostatku glukoze Bad se defosforiliše i vezuje za antiapoptotske Bcl-2 proteine, čime omogućava proapoptotskim proteinima Bax i Bak da otpočnu apoptozu (Danial, 2009).

Osim Bad proteina i drugi BH3 proteini mogu učestvovati u inicijaciji apoptoze usled nedostatka nutrijenata. Na primer, Bid protein (*engl.* BH3 interacting-domain death agonist) izaziva aktivaciju apoptoze preko endoplazmatskog retikuluma koji je osetljiv na nedostatak nutrijenata neophodnih za posttranslacione modifikacije proteina. Zbog toga mnogi autori smatraju da upravo nedostatak glukoze, ili drugih osnovnih metabolita, ima veći uticaj na aktivaciju ćelijske smrti nego nedostatak ATP-a (Caro-Maldonado i Munoz-Pinedo, 2011). Na ovaj način, Bad i Bid proteini imaju dvostruke uloge, kao regulatori apoptoze i senzori za određene nutrijente, čime se omogućava integracija energetskeg metabolizma i ćelijske smrti. Nekoliko studija je pokazalo da nedostatak glutamina takođe može biti uzročnik apoptoze i da je ona aktivirana unutrašnjim putem, povećanjem sinteze proapoptotskih Bcl-2 proteina (Julie i dr., 2005; Yuneva i dr., 2007).

Sem apoptoze i nekroza može biti uzrokovana nedostatkom hranljivih materija, mada ređe. Mehanizmi koji pokreću nekrozu u ovakvim uslovima još uvek nisu u dovoljnoj meri razjašnjeni. Poznato je da se usled gladovanja i ishemije povećava produkcija ROS/RNS koji dovode do povećane oksidacije ćelijskih komponenti i poremećene redoks ravnoteže – disbalansa između sinteze i razgradnje ključnih antioksidanasa (glutaciona, NADPH i ostalih). Posledica takve prooksidativne sredine je nekroza koja se javlja bez obzira na prisustvo ili odsustvo apoptotske mašinerije u ćeliji (Broughton i dr., 2009).

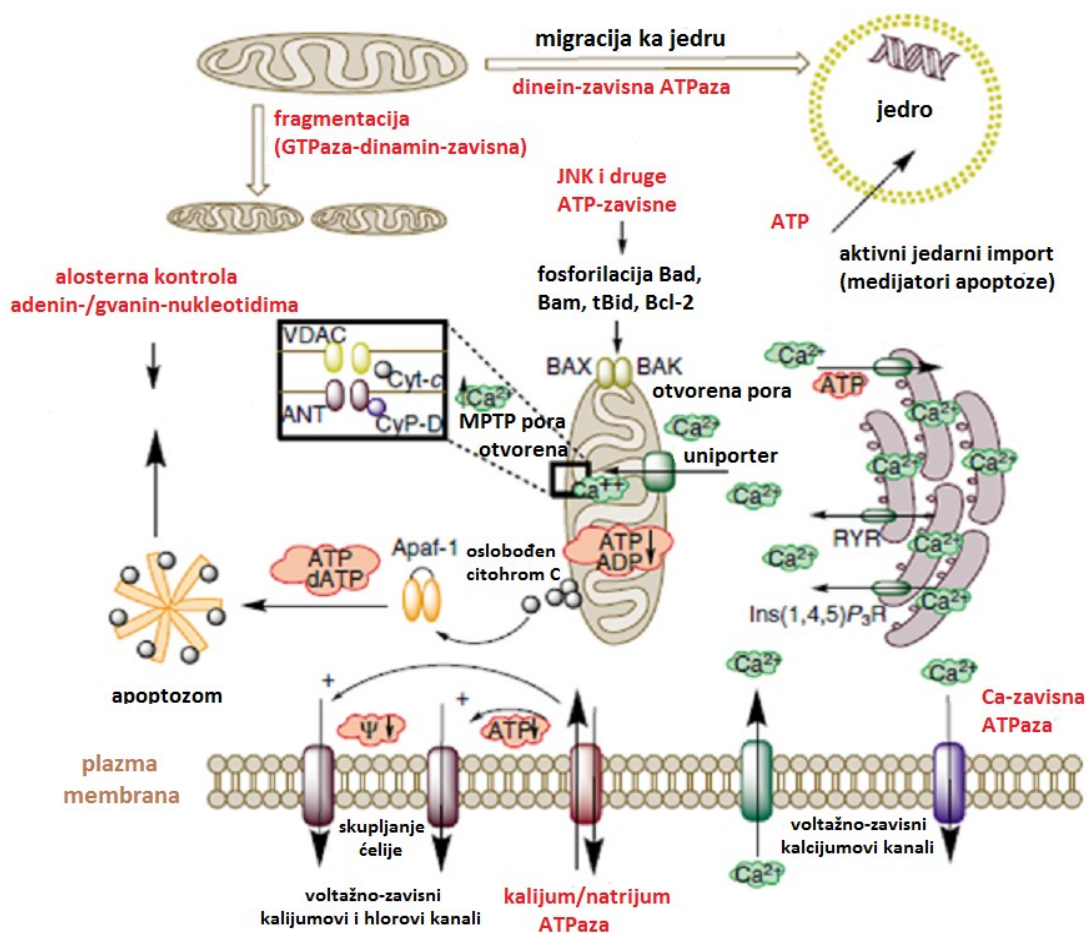
Trenutno se znanje o ćelijskoj smrti kod beskičmenjaka, koji čine oko 90% životinjskog sveta, bazira na istraživanjima na malom broju vrsta, a najviše na

studijama dva vodeća model organizma – valjkastom crvu *C. elegans* i vinskoj mušici *Drosophila spp.* Imajući u vidu veliku raznovrsnost i brojnost vrsta beskičmenjaka, generalizovati znanje o ćelijskoj smrti dobijeno od nekoliko nesrodnih vrsta na sve beskičmenjačke grupe bilo bi pogrešno, makar se radilo i o univerzalnim biološkim procesima koji su u osnovi evolutivno očuvani. Takođe, potpuna je nepoznanica regulacija ćelijske smrti u uslovima produženog gladovanja i hipometabolizma koji su karakteristika brojnih dormancija, pa i dijapauze. Poznato je da kod sisara hipometaboličko stanje ćelije dovodi do aktivacije apoptotskih puteva (Slika 11) zbog smanjenja nivoa ATP-a, rasta ADP-a i AMP-a, „curenja“ jona (*engl.* ion leakage)  $\text{Ca}^{2+}$  i drugih metala, usled male aktivnosti membranskih jonskih pumpi (Hochachka i Somero 2002; Hand i Menze, 2008; Staples i Buck, 2009; Caro-Maldonado i Munoz-Pinedo, 2011).

Jedan od neuobičajenih i relativno novih model organizama kod koga se proučava ćelijska smrt u uslovima mirovanja i hipometabolizma je račić *A. franciscana*. Embrioni ove vrste ulaze u osmobiozu, duboku metaboličku depresiju, usled povećanja saliniteta vode i u takvom stanju mogu preživeti nekoliko godina, a u slučaju anoksije, mogu preživeti nekoliko desetina godina na sobnoj temperaturi (Clegg, 1997), bez znakova apoptoze ili nekroze.

Kod ovog organizma utvrđeno je da su mitohondrije tolerantne na visoku koncentraciju  $\text{Ca}^{2+}$  u citoplazmi (preko 1 mM), za razliku od sisarskih ćelija koje pri deset puta manjoj koncentraciji (<100  $\mu\text{M}$ ) podležu patološkim promenama (Menze i dr., 2005). Naime, u sisarskoj ćeliji povećanje koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  u prisustvu neorganskog fosfata kao koaktivatora, a naročito u uslovima oksidativnog stresa i smanjene količine adenin nukleotida, izaziva bubrenje mitohondrija, remećenje respiracije, kao i oslobađanje citohroma *c* i drugih metabolita veličine do 1,5 kDa u citoplazmu. Izlazak metabolita iz matriksa i međumembranskog prostora je direktna posledica pojave prolaznih otvora (MPTP) na membrani mitohondrija. Oslobađanjem sadržaja iz međumembranskog prostora mitohondrija dolazi do aktivacije unutrašnjeg puta apoptoze (Bernardi i dr., 1998).

MPTP otvori predstavljaju proteinske komplekse koji se sastoje od najmanje tri proteina – voltažno zavisnog anjonskog kanala (VDAC, *engl.* voltage-dependent anion channel), adenindinukleotid translokatora i peptidil-proлил cis-trans izomeraze (PPI) ciklofilin D (Bernardi i dr., 1998).



**Slika 11.** Koraci na kojima dostupnost energije (osjenčeno/ispisano crvenom) ili koncentracija  $\text{Ca}^{2+}$  (osjenčeno zelenom) mogu uticati na programiranu ćelijsku smrt. Prerađeno prema Hand i Menze, 2008.

Western blot analize su pokazale da mitohondrije *A. franciscana* poseduju sve tri neophodne komponente (Menze i dr., 2005). Ipak, pore se ne otvaraju ni posle dodatka više od 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , niti se oslobađa citohrom *c* što verovatno predstavlja svojevrсни vid zaštite embriona tokom anoksije (Menze i dr., 2005). Autori spekuliraju da prisustvo neaktivnih MPTP u membrani mitohondrija *A. franciscana* može predstavljati osobinu mitohondrija svih beskičmenjaka (Menze i dr., 2005; Hand i Menze, 2008).

Dalje, Menze i saradnici (2005, 2008) su otišli korak dublje u istraživanju regulacije ćelijske smrti u kriptobiozi embriona *A. franciscana*, proučavajući aktivnost kaspaza, njihove aktivatore i inhibitore. Utvrdili su da se po dodatku citohroma *c* u citosolni ekstrakt embriona, ne aktiviraju ni kaspaza 9 niti kaspaza 3. Ovo je potvrdilo rezultate proučavanja mehanizama apoptoze kod pojedinih insekatskih vrsta, kod kojih je dokazano da citohrom *c* verovatno nema istu ulogu u aktivaciji unutrašnjeg puta apoptoze, kao što ima kod sisara.

Takođe, u studijama na *A. franciscana* utvrđeno je da je aktivnost kaspaze 9 u prisustvu različitih koncentracija KCl osetljiva na dodatak egzogenog  $\text{Ca}^{2+}$ . KCl deluje inhibitorno pri svim ispitivanim koncentracijama, ako je dodat sam, dok u prisustvu 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  KCl pri nižim koncentracijama aktivira, a pri višim inhibira kaspazu 9 (Menze i Hand, 2007; Hand i Menze, 2008). Poznato je da KCl u sisarskoj ćeliji utiče inhibitorno na kaspazu 9 ometajući formiranje apoptozoma, jer se takmiči sa citohromom *c* za vezno mesto na Apaf-1 proteinu (Cain i dr., 2001).

Sa druge strane, s obzirom na to da kod dijapauzirajućih embriona *A. franciscana* izostaje aktivacija MPTP i da se ne oslobađa citohrom *c* iz mitohondrija, pretpostavlja se da KCl utiče na aktivnost kaspaze 9 tako što ometa interakciju apoptozoma i prokaspaze 9. Takođe, pri niskim koncentracijama KCl,  $\text{Ca}^{2+}$  deluje kao aktivator, a pri visokim kao inhibitor kaspaze 9, što je verovatno posledica promenljivosti koncentracije  $\text{K}^{+}$  tokom životnog ciklusa – menjanjem saliniteta vode (Menze i Hand, 2007; Hand i Menze, 2008).

Slično kao kod sisarskih ćelija, utvrđeno je da i visoke koncentracije ATP-a u prisustvu  $\text{MgCl}_2$  (>1,25 mM) mogu da inhibišu aktivnost kaspaze 9 u ekstraktu embriona, a da slobodan GTP ima slične efekte. Za razliku od ATP i GTP nukleotida, ADP u prisustvu  $\text{Mg}^{2+}$  inhibira aktivnost kaspaze 9 bez obzira na koncentraciju, ali je inhibitorni efekat 60 puta jači kod dijapauzirajućih u odnosu na postdijapauzirajuće embrione. Zbog toga što se koncentracija ADP-a ne menja između dve navedene faze dijapauze, zaključeno je da različita osetljivost kaspaze 9 na  $\text{Mg}^{2+}$ -ADP predstavlja svojevrsan vid prevencije apoptoze tokom dijapauze i povećanog saliniteta vode (Menze i Hand, 2007; Hand i Menze, 2008).

## 1.6 Značaj proučavanja dijapauze

Proučavanje i bolje razumevanje procesa koji se dešavaju tokom dijapauze imaju ne samo značaj u domenu osnovnih nauka, biologije i ekologije, već ovo znanje može biti i praktično primenjivo. Naime, dijapauza je skoro jedan vek u žiži bioekoloških istraživanja, a najviše sa ciljem razvoja efikasnijih strategija za suzbijanje insekatskih vrsta koje su štetočine.

S obzirom na to da je dijapauza vrlo značajna za život insekata, bilo kakvo odlaganje, prerano prekidanje dijapauze ili interferencija sa mehanizmima skladištenja i očuvanja energetske rezervi može imati negativne posledice na preživljavanje insekata (Denlinger, 2008). Naučna saznanja o mogućnostima upravljanja i kontrole dijapauze mogu biti od koristi u razvoju praktičnih strategija kontrole insekatskih vrsta koje nanose ekonomsku štetu poljoprivredi i industriji. Upotrebom bioloških metoda smanjila bi se upotreba pesticida, što je jedan od temelja održive poljoprivrede. Osim toga, ove metode bi mogle imati mnogo veću specifičnost tj. selektivnost, čime bi se mogle zaštititi i korisne insekatske vrste koje su ugrožene upotrebom insekticida. Razumevanje dijapauze je od značaja i za gajenje korisnih insekata – polinatora (npr. bumbari i pčele), svilenih buba, predatora (npr. bubamara) i ostalih (Denlinger, 2008).

Za istraživače koji koriste insekte kao model organizme veoma je značajno gajenje i održavanje insekatskih kultura (*engl.* insect stocks), koje trenutno iziskuje veliki ekonomski izdatak. Smatra se da krioprezervacija ili uvođenje u dijapauzu može omogućiti produženo/neograničeno čuvanje insekatskih embriona (Košťál i dr., 2011; Denlinger, 2008). Shvatanje mehanizama pomoću kojih insekti preživljavaju niske temperature mogu doprineti razvoju kriobiologije i novih tehnika za krioprezervaciju organa i tkiva (Clark i Worland, 2008). S obzirom na to da insekti imaju specifičan set metabolita tokom dijapauze, insekti mogu biti potencijalni novi izvori lekova, ali i dobri model organizmi za proučavanje neinfektivnih bolesti savremenog doba, kao što su gojaznost i dijabetes (Denlinger, 2008).



## 1.7 Kukuruzni plamenac (*Ostrinia nubilalis*, Hbn.)

Kukuruzni plamenac, *Ostrinia nubilalis* (Hbn., 1796) pripada redu leptira – *Lepidoptera*, superporodici – *Pyraloidea*, porodici *Pyralidae*, podporodici *Pyraustinae* u koju je svrstan i rod *Ostrinia* (Tabela 3) (Szaboky et al., 2002; Béliń, 2003; Brajković, 2004; Brajković i Ćurčić, 2008; Sekulić i dr., 2008; Kereši i dr., 2011; Stojanović, 2012).

Kao vrsta prvi put je opisana pod imenom *Pyralis nubilalis* od strane nemačkog entomologa Jakoba Hibnera (*nem.* Jakob Hübner), a naziv vrste i familije kojoj pripada je bio više puta menjan.

**Tabela 3.** Sistematska klasifikacija kukuruznog plamenca *O. nubilalis*.

Sistematska kategorija	
Carstvo	Animalia
Tip	Arthropoda
Klasa	Insecta
Red	Lepidoptera
Superporodica	Pyraloidea
Porodica	Pyralidae (Crambidae*)
Podporodica	Pyraustinae
Rod	Ostrinia
Vrsta	<i>Ostrinia nubilalis</i>

\*objašnjenje je dato u tekstu

Iako brojni autori podržavaju datu sistematsku klasifikaciju (Tabela 3), određen broj entomologa superfamiliju *Pyraloidea* dele na dve familije *Pyralidae* i *Crambidae* (Leraut, 2012; Slamka 2006, 2008, 2013), a rod *Ostrinia* svrstavaju u familiju *Crambidae*.

Kukuruzni plamenac je moljac, izvorno Evroazijska vrsta, koji je danas široko rasprostranjen u Evropi i Aziji (Slika 12), ali i u Severnoj Africi i Severnoj Americi gde se raširio tokom XX veka (Lassance, 2010; Sole i dr., 2010).



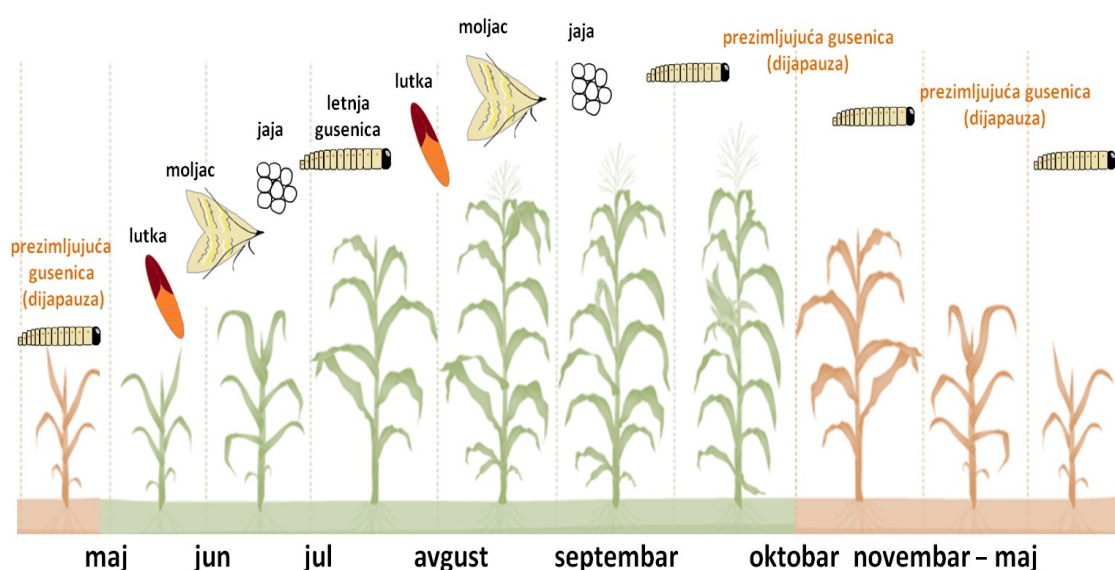
**Slika 12.** Rasprostranjenost evropskog kukuruznog i plamenca *O. nubilalis*. Prerađeno prema Lassance, 2010.

Gusenice *O. nubilalis* najčešće se razvijaju na kukuruзу. U početku se hrane vrhom stabljike, a posebno kukuruznom metlicom koja iz tog razloga najčešće bude polomljena. Kasnije, obično nakon trećeg presvlačenja, ulaze u stabljiku, gde formiraju karakteristične šupljine. Unutar stabljike gusenice dolaze do samog klipa oštećujući floem i ksilem biljke. Biljka toleriše prisustvo jedne do dve gusenice u stabljici bez vidljivih efekata.

Gusenice letnje generacije nanose najviše štete kukuruзу i zato je *O. nubilalis* jedna od najvećih štetočina kukuruza. Osim kukuruza, još preko 300 raznih biljnih vrsta predstavlja hranu gusenicama kukuruznog plamenca. To su uglavnom biljne vrste koje imaju dovoljno debele stabljike da u njima mogu da se uvuku gusenice poslednjeg stupnja – npr. krompir, paprika, duvan i slično (Sole i dr., 2010).

### Životni ciklus

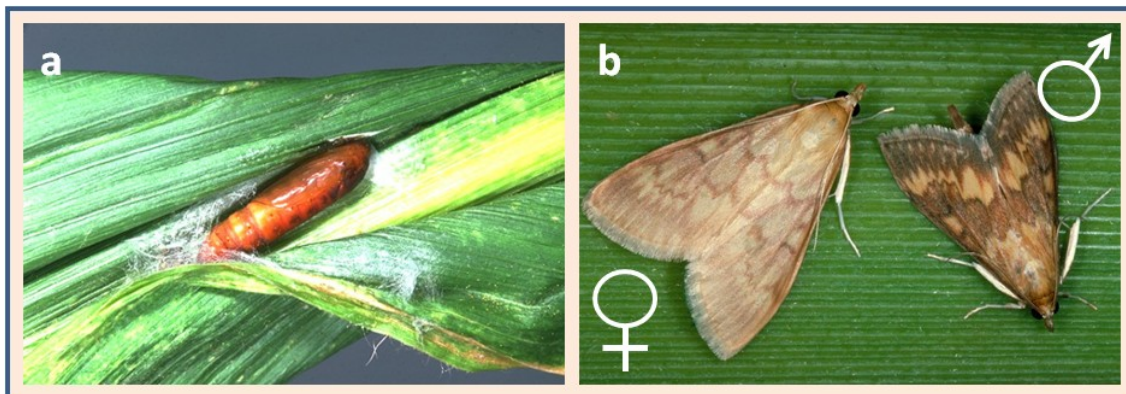
Kukuruzni plamenac, kao holometabolni insekt, tokom ontogenetskog razvoja prolazi kroz potpuni preobražaj (metamorfozu) koji obuhvata četiri stadijuma: jaje, larvu (gusenicu), lutku i odrasle jedinice (moljca, imaga). Četiri pomenuta razvojna stadijuma predstavljaju životni ciklus jedne generacije kukuruznog plamenca i on prosečno traje od 4 do 6 nedelja u poljskim uslovima. Ukupan broj generacija po godini se menja, u zavisnosti od klimatskih uslova i vegetacijskih fenofaza (Slika 13).



**Slika 13.** Životni ciklus kukuruznog plamenca.

Do osamdesetih godina prošlog veka u našim krajevima kukuruzni plamenac je imao jednu generaciju tokom godine (univoltna vrsta), dok se u poslednjih nekoliko decenija broj generacija po godini povećao (multivoltna vrsta). Uočena je pojava postojanja najmanje dve generacije – jedne zimske i najmanje jedne letnje, a ukupan broj generacija menja se iz godine u godinu, što najviše zavisi od temperaturnih kolebanja i količine padavina (Bača i dr., 2007). U skladu sa globalnim klimatskim promenama, predviđa se da će se broj generacija kukuruznog plamenca povećati, a areal rasprostranjenja proširiti ka severu i ka većim nadmorskim visinama (Kocmánková i dr., 2008).

Gusenice koje izlaze iz dijapauze se ulutkavaju tokom maja, a gusenice letnje generacije tokom jula i avgusta (Slika 13). Nakon formiranja, lutka je svetlo-smeđe boje, a potom tamni i prelazi u braon boju (Slika 14a).



**Slika 14.** Kukuruzni plamenac *Ostrinia nubilalis*: (a) lutka i (b) adulti. (Internet 3).

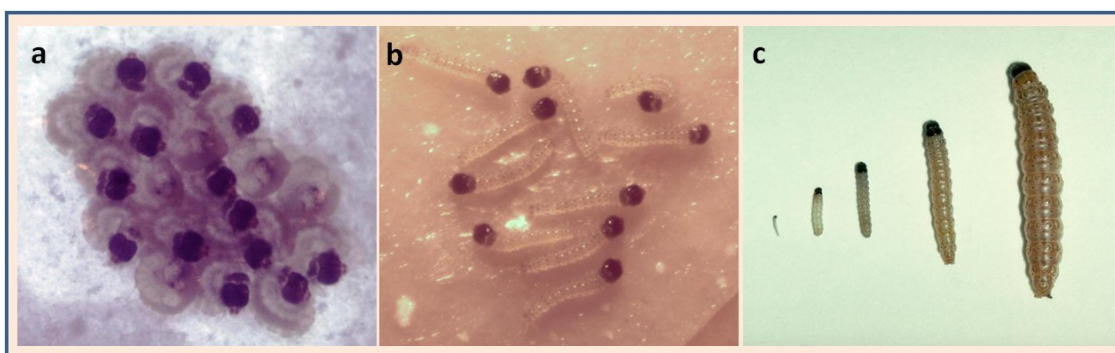
Već u stadijumu lutke može se uočiti polni dimorfizam – lutka mužjaka je sitnija, dužine 13–14 mm i 2–2,5 mm širine, a lutka ženki je krupnija, 16–17 mm dugačka i 3,5–4 mm široka. Na kraju abdomena nalazi se od 5–8 kukica koje služe da se lutka zakači za tanak kokon u kome se obično, ali ne i uvek, nalazi. Dužina ovog razvojnog stadijuma u poljskim uslovima je oko 12 dana, a donja temperaturna granica je 13°C (Sekulić i dr., 2008).

Lutka se preobražava u adulta i iz čaure izlaze – moljci, koji se odlikuju polnim dimorfizmom izraženim u veličini i kombinaciji boja i šara krila (Slika 14b). Ženke su krupnije, sa rasponom krila od 25 do 34 mm i svetlo žute do svetlo-braon boje sa dve tamne cik-cak linije. Mužjaci imaju raspon krila od 20 do 26 mm koja su tamno-braon boje sa krivudavom trakom blede-žute boje. Moljci žive od 18 do 24 dana, najaktivniji su noću i hrane se nektarom.

Ženke zimske generacije, starosti 3–4 dana, najčešće na naličju listova, polažu između 20 i 50 jaja dnevno u grupama od po 15–20 (Slika 15a). Jedna ženka polaže jaja u periodu od 10 do 14 dana, a ukupno može položiti između 400 i 600 jaja. Jaja su blede-žute boje, dok sa razvojem embriona postaju tamnija. Razvoj u jajetu traje 4–9 dana u zavisnosti od spoljašnjih uslova, a pre svega temperature, pri čemu je

15°C donja temperaturna granica za uspešan razvoj. Polaganjem jaja završava se životni ciklus zimske generacije (Sekulić i dr., 2008).

Kada se na jajima pojave crne tačke, glavena kapsula (Slika 15a), iz jaja se najčešće u narednih 24 časa izležu gusenice dužine 1,6 mm sa tamno smeđom hitinskom glavenom kapsulom i telom bledo-žute boje (Slika 15b). Telo gusenice podeljeno je na 14 telesnih segmenata. Prva tri segmenta predstavljaju torakalni deo i nose po par člankovitih nogu, a narednih deset segmenata čine abdominalni deo, od kojih treći, četvrti i peti nose po par lažnih abdominalnih nožica.



**Slika 15.** Kukuruzni plamenac *O. nubilalis*: (a) izleganje gusenica iz jaja, (b) gusenice starosti jedan dan (Foto: Ž. Popović, septembar 2010) i (c) gusenice svih pet stupnja (Internet 3).

Poslednji segment takođe ima dve lažne nožice. Duž dorzalne strane tela proteže se tamna pruga sa čije se obe strane na svakom segmentu nalaze sitne tamne pege (Slika 15c). Stadijum gusenice normalno prolazi kroz pet (Slika 15c), a prema nekim izvorima i šest razvojnih stupnjeva. Srednje dužine tela gusenica od 1. do 5. stupnja su: 2,6 mm, 4,7 mm, 12,5 mm, 14,5 mm i 19,9 mm (Capinera, 2000). Donja temperaturna granica za razvoj gusenice je 11°C, a dužina stupnja varira u zavisnosti od temperature i vlažnosti u spoljašnjoj sredini.

Poslednja letnja generacija moljaca završava svoj životni ciklus polaganjem jaja, iz kojih se izležu gusenice koje će prezimiti u dijapauzi (Capinera, 2000). Počev od sredine leta do jeseni, dužina dana se skraćuje, a temperatura počinje da opada. Ove sredinske promene su signali koji se preko receptora prenose do CNS-a gde predstavljaju „okidače“ za gene koji su u vezi sa kontrolom bioloških ritmova

(dnevni i sezonski), a koji usklađuju životni ciklus jedinke sa ekološkim faktorima na staništu. Posledica toga je zaustavljanje razvoja larvi kukuruznog plamenca u petom stupnju i ulazak u stanje dijapauze.

Tokom pripreme za dijapauzu, gusenice se intenzivno hrane nagomilavajući energetske rezerve. Kada uđu u dijapauzu, larve ne piju vodu, ne hrane se, snižavaju stopu metabolizma i slabije se kreću. Osim toga, u toku dijapauze, one usmeravaju svoje metaboličke procese ka proizvodnji zaštitnih molekula, te gusenice vremenom postaju otporne na niske temperature (do  $-30^{\circ}\text{C}$  u poljskim uslovima) i mogu preživeti zamrzavanje vanćelijske tečnosti (Grubor-Lajšić i dr., 1991). Na ovaj način, ulazak u dijapauzu predstavlja adaptivnu strategiju preživljavanja zime. Na proleće, nakon pojave povoljnih uslova, gusenice počinju da se ulutkavaju u maju i razvojni ciklus se opet ponavlja (Slika 13).

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Ciljevi istraživanja u ovoj disertaciji bili su da se:

- ispituju promene u prometu vode tokom dijapauze kukuruznog plamenca merenjem sadržaja ukupne, osmotski aktivne i osmotski neaktivne vode, kao i njihove tkivne distribucije;
- ispituju promene u osmolalnosti hemolimfe i tački superhlađenja različitih tkiva kukuruznog plamenca;
- ispita stepen metaboličke depresije tokom dijapauze kukuruznog plamenca praćenjem koncentracije najvažnijih nukleotida i koenzima, merenjem aktivnosti citohrom *c* oksidaze, određivanjem energetske naboja i relativne ekspresije gena pojedinih subjedinica različitih kompleksa elektron-transportnog lanca;
- ispita dinamika ekspresije različitih gena čiji produkti učestvuju u energetskom metabolizmu ćelije (oksidativna fosforilacija), zaštiti od stresa (HSP, antioksidativni molekuli, regulatori koncentracije metala i dr.) i drugim procesima;
- ispita postoje li apoptotske promene na morfološkom, biohemijskom i molekularnom nivou u dijapauzi *Ostrinia nubilalis* i dobije uvid u mehanizme ćelijske smrti kod još jedne vrste insekata,
- na osnovu svih sprovedenih ispitivanja stekne bolji uvid u molekulske i biohemijske osnovu dijapauze i mehanizama adaptacije na stres tokom dugog perioda mirovanja i gladovanja evropskog kukuruznog plamenca.



## **3. MATERIЈAL I METODE**

### 3.1 Sakupljanje biološkog materijala i gajenje u laboratorijskim uslovima

Jajna legla kukuruznog plamenca *Ostrinia nubilalis* dobijena su iz Laboratorije za entomologiju Instituta za kukuruz iz Zemun Polja, a nedijapauzirajuće larve su sakupljene na obradivim površinama Instituta i odgajane u laboratorijskim uslovima. Jajna legla korišćena za uspostavljanje laboratorijske populacije kukuruznog plamenca pripremana su na sledeći način:

- ❖ 5 min dezinfekcija potapanjem u 4% (v/v) rastvor sveže pripremljenog Persteril-a (Persteril 36 proizvođač OVERLACK, Češka republika),
- ❖ ispiranje destilovanom vodom tri puta i
- ❖ postavljanje legala u kutije sa izlivenom veštačkom hranljivom podlogom za gajenje larvi i njihovo odlaganje u inkubatore sa odgovarajućim uslovima – diijapauzirajućim i nedijapauzirajućim.

Hranljiva podloga za gajenje larvi pripremana je na sledeći način (količina sastojaka data je u Tabeli 4):

- ❖ u pšenične i ječmene klice dodat je 1 litar hladne vode, smeša je dobro izmešana i ostavljena da odstoji najmanje 30 min ili preko noći;
- ❖ agar je rastvoren u 120 mL hladne vode (ili manje), a magnetnom mešalicom je napravljen homogeni rastvor koji je pomešan sa prethodnom smešom od klica;
- ❖ smeši od klica i agara dodat je pivski kvasac, smeša je dobro izmešana i zagrevana do ključanja uz povremeno mešanje, a potom kuvana uz neprestano mešanje;
- ❖ kada je postignuta zadovoljavajuća gustina smeše, smeša je ohlađena do 70°C, a potom su postepeno dodati metilparaben, formaldehid, limunska kiselina, sorbična kiselina, vitamin C i vitamini B-kompleksa;
- ❖ po dodavanju vitamina, kiselina i konzervansa smeša je dobro izmešana, ohlađena do 40–50°C i potom razlivena u posude za gajenje insekata;

- ❖ posude sa hranom su najmanje 1 čas površinski sterilisane pod UV lampom, nakon čega su odmah korišćene ili odlagane u hladnu sobu gde su čuvane nekoliko meseci.

Za gajenje larvi insekata korišćene su prozirne plastične kutije sa poklopcem Vanička 250/31 proizvođača FATRA (Č. republika) sledećih karakteristika: zapremine 250 mL, dužine 11,20 cm, širine 8,4 cm i dubine 5,35 cm. Kako su kutije namenjene prehrambenoj industriji i napravljene tako da propuštaju gasove u maloj meri, radi nesmetanog ulaska vazduha, poklopci su bili probušeni sa 24 rupe dijametra 2mm.

**Tabela 4.** Sastojci jednog kilograma hranljive podloge za gajenje larvi.

Komponenta	Sadržaj (g)	Komponenta	Sadržaj (g)
1. Agar	20	6. Limunska kiselina	5
2. Pšenične klice	160	7. Sirćetna kiselina	1,4
3. Ječmene klice	25	8. Metilparaben	1,7
4. Pivski kvasac	25	9. B-kompleks	0,07
5. Vitamin C	5	10. Formaldehid 37%	6

#### *Gajenje moljaca (adulta)*

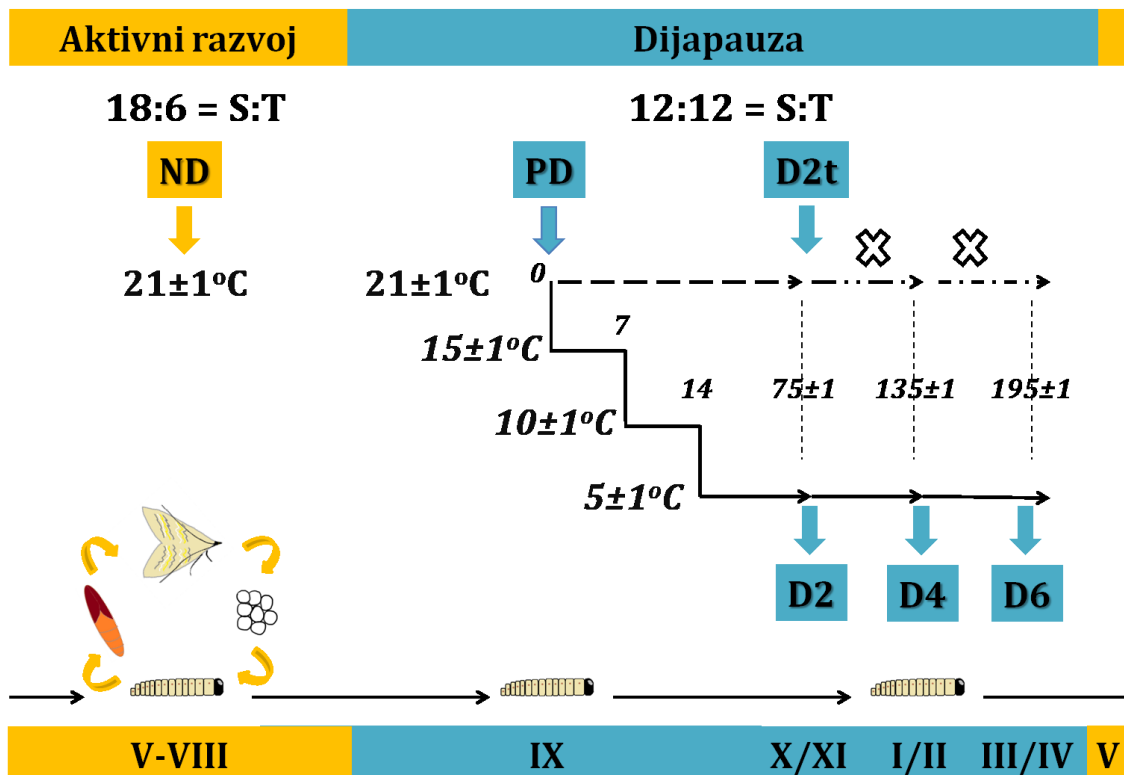
Larve petog stupnja u fazi lutanja (*engl. wandering larvae*) su vađene iz kutija sa hranljivom podlogom i sakupljane u posebnoj plastičnoj kutiji sa rebrastim kartonom, gde su se uvlačile u papirna rebra (5mm širine) i ulutkavale. Po izlasku iz lutke, moljci su bili odvajani u poseban kavez za parenje na čijim stranicama su bili postavljeni vlažni filter-papiri na kojima su ženke polagale jaja u vidu jajnih legala. Jajna legla su svakodnevno sakupljana, isecana sa filter-papira i pre stavljanja na hranljivu podlogu su sterilisana na prethodno opisan način.

### 3.2 Postavka eksperimenta

Kutije sa hranljivim podlogama i jajnim leglima postavljane su pod različite temperaturne i svetlosne tretmane u inkubatorima marke MIR-154 (SANYO E&E Europe BV, UK), radi formiranja eksperimentalnih grupa (Slika 16).

Zbog bržeg i sinhronizovanog izleganja gusenica, sva jajna legla su u početku gajena na istoj temperaturi od  $22\pm 1^\circ\text{C}$ , ali pod različitim svetlosnim uslovima:

- ❖ *fotoperiodom sa kraćom skotofazom* (grč. skotos – mrak), 18 h svetlo i 6h mrak, uslovima koji podstiču neprekidni razvoj insekata i uspostavljanje kontrolne, nedijapauzirajuće grupe (ND);
- ❖ *fotoperiodom sa dužom skotofazom*, 12 h svetlo i 12 h mrak, uslovima koji podstiču larve na pripremu i ulazak u dijapauzu (Slika 16).



Slika 16. Šematski prikaz postavke eksperimenta. Objašnjenje je dato u tekstu.

Nakon ulaska larvi petog stupnja u fazu lutanja, koja se ogleda prestankom uzimanja hrane i vode, izlaskom larvi iz hranljive podloge i lučenjem svilene opne za zaštitu budućeg kokona, gusenice su sakupljane i raspoređene na sledeći način:

- ❖ jedan broj larvi je odmah zamrznut u tečnom azotu i odlagan na  $-80^{\circ}\text{C}$  ili sveže pripreman za analize predstavljajući eksperimentalnu grupu gusenica *predodređenih za dijapauzu*, tzv. predijapauzirajuća PD grupa;
- ❖ drugi deo larvi je gajen na temperaturi od  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$  još dva meseca nakon čega su gusenice zamrzavane u tečnom azotu i odlagane na  $-80^{\circ}\text{C}$  ili sveže pripremane za analize predstavljajući novu eksperimentalnu grupu *gusenica u dijapauzi na visokoj temperaturi D2t* (u dijapauzi 2 meseca, starosti oko  $75\pm 1$  dana);
- ❖ treći deo larvi je u toku dve nedelje, postepenim spuštanjem temperature za po  $8^{\circ}\text{C}$  nedeljno, sa temperature od  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$  aklimatizovan na temperaturu od  $5^{\circ}\pm 1\text{C}$  i od njih su formirane grupe za praćenje toka dijapauze tako što su larve na svaka dva meseca odvajane za analizu ili zamrzavane i odlagane na  $-80^{\circ}\text{C}$ , čineći tri nove eksperimentalne grupe toka dijapauze:
  - *početak dijapauze* – grupa D2 (2 meseca u dijapauzi, starosti oko  $75\pm 1$  dana),
  - *sredina dijapauze* – grupa D4 (4 meseca u dijapauzi, starosti oko  $135\pm 1$  dana) i
  - *kraj dijapauze* – grupa D6 (6 meseci u dijapauzi, starosti oko  $195\pm 1$  dana).

U celokupnom eksperimentu, za različite analize, korišćeno je ukupno 7 eksperimentalnih grupa prikazanih u Tabeli 5.

**Tabela 5.** Pregled svih eksperimentalnih grupa korišćenih u analizama.

Oznaka	Kratak opis eksperimentalne grupe	Uslovi gajenja	
		T (°C)	S:T (h)
<b>ND</b>	nedijapauzirajuće gusenice petog stupnja, drugi dan faze lutanja	22±1	18:6
<b>PD</b>	gusenice petog stupnja predodređene za ulazak u dijapauzu, drugi dan faze lutanja	22±1	12:12
<b>D2t</b>	dijapauzirajuće gusenice petog stupnja gajene 2 meseca na temperaturi pogodnoj za kontinuiran razvoj		
<b>D2</b>	dijapauzirajuće gusenice petog stupnja gajene 2 meseca na niskoj temperaturi, aklimatizovane na niske temperature	5±1	
<b>D4</b>	dijapauzirajuće gusenice petog stupnja gajene 4 meseca na niskoj temperaturi, aklimatizovane na niske temperature		
<b>D6</b>	dijapauzirajuće gusenice petog stupnja gajene 6 meseca na niskoj temperaturi, aklimatizovane na niske temperature		
<b>L</b>	lutke dobijene iz grupe nedijapauzirajućih larvi	22±1	18:6

Skraćenice:

S (svetlo), T (tama), ND (nedijapauzirajuće); PD (predijapauzirajuće), D (dijapauzirajuće); L lutke; t (toplo); brojevi 2, 4 i 6 predstavljaju mesece trajanja dijapauze.

### 3.3 Priprema uzoraka

Za analize su korišćena različita sveža ili zamrznuta tkiva (detaljnije u tekstu), homogenati tkiva, homogenati celih gusenica ili homogenati celih lutki, kao i citosolne i mitohondrijske frakcije homogenata.

#### *Disekcija gusenica*

Za disekciju su korišćeni instrumenti sterilisani 70% etil-alkoholom, a gusenice su disekovane pod binokularnom lupom i na crnoj parafinskoj podlozi.

Pre disekcije, zasecanjem poslednjeg para lažnih nogu, iz gusenica je blagim pokretima iscedena hemolimfa. Hemolimfa je ili korišćena u daljim analizama ili odbačena.

Gusenice su fiksirane uzdužno, okrenute leđnom stranom ka parafinskoj podlozi, korišćenjem entomoloških igli. Telo gusenice je otvarano pravljenjem uzdužnog trbušnog reza, nakon čega je kutikula zategnuta entomološkim iglama, a željena tkiva su isecana, korišćena u daljim analizama ili potapana u odgovarajuće rastvore, zamrzavana i odlagana na  $-80^{\circ}\text{C}$  do korišćenja.

Za željene analize i njihovu pripremu su korišćena sledeća tkiva gusenica – hemolimfa, masno telo, svilene žlezde, srednje crevo i epidermis sa kutikulom.

#### *Homogenizacija tkiva, celih gusenica i lutki*

Za homogenizaciju je korišćen ili poluautomatski teflonsko-stakleni homogenizer Schuett homgen<sup>plus</sup> (Schuett Biotech, Nemačka) ili ručni homogenizer Pellet Pestle Cordless Homogenizer, model 47747–370 (VWR, Pennsylvania, USA).

Postupak homogenizacije je dat za svaku analizu ponaosob.

### 3.4 Laboratorijske analize

#### 3.4.1 Gravimetrijsko određivanje sadržaja ukupne vode

Količina ukupne vode (*TW*, *engl.* total water) u celim larvama i odabranim tkivima (hemolimfa, masno telo, svilene žlezde, srednje crevo i epidermis sa kutikulom) određivana je gravimetrijskom metodom.

Sveža masa (*FW*, *engl.* fresh weight) gusenica i tkiva merena je na preciznoj vagi osetljivosti od 0,01 mg (BA110S, Sartorius, Nemačka), nakon čega su uzorci podvrgavani sušenju na 60°C do postizanja konstantne suve mase (72 časa).

Merenjem suve mase (*DW*, *engl.* dry weight) i njenim oduzimanjem od sveže mase dobijen je sadržaj ukupne vode u uzorcima:

$$TW \text{ [mg]} = FW - DW$$

Sadržaj ukupne telesne vode (*TBW*, *engl.* total body water) izražen je kao procenat ukupne vode u svežoj masi:

$$TBW \text{ [%]} = \frac{TW}{FW} \cdot 100$$

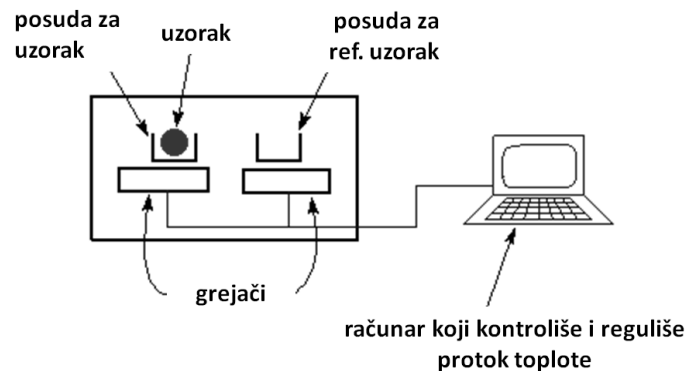
Sadržaj osmotski aktivne (*OA*) vode u tkivima određivan je diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom (*DSC*, *engl.* Differential Scanning Calorimetry), a sadržaj osmotski neaktivne vode (*OI*, *engl.* osmotically inactive) računat je iz razlike količine ukupne vode i količine *OA*:

$$OI \text{ [mg]} = TW - OA$$



### 3.4.2 Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija

Za merenje tačke superhlađenja, količine slobodne vode i određivanje vezane vode u tkivima kukuruznog plamenca korišćena je diferencijalna skenirajuća kalorimetrija. DSC pripada termoanalitičkim tehnikama i ima široku primenu u istraživanjima fizičko-hemijskih osobina polimera (tačka topljenja, temperatura prelaznog stanja), termalnih promena tokom faznih prelaza, reakcija oksidacije, kao i praćenja termalnih promena kod drugih hemijskih reakcija. Uređaj koji meri ove promene se naziva diferencijalni skenirajući kalorimetar (Slika 17).



**Slika 17.** Šematizovan princip rada diferencijalnog skenirajućeg kalorimetra.

DS kalorimetar je uređaj koji meri razliku u količini toplote koja je potrebna da bi se temperature uzorka i reference (Slika 17), podvrgnutih različitim toplotnim tretmanima hlađenja i grejanja, održale jednakim. Kao referentni uzorak najčešće se koriste metali (indijum ili cink) i različite organske supstance (n-dodekan, cikloheksan), i on mora imati dobro poznat i opisan toplotni kapacitet u datom temperaturnom opsegu skeniranja koji se primenjuje u merenjima.

U ovoj disertaciji korišćen je kalorimetar DSC4000 (Perkin Elmer), a DSC analiza je rađena na uzorcima hemolimfe, srednjeg creva, svilenih žlezda, masnog tela i epidermisa sa kutikulom u nedijapauzirajućim i dijapauzirajućim eksperimentalnim grupama gusenica petog stupnja.

Pre DSC analize, izvršena je disekcija larvi radi dobijanja svežeg tkiva (hemolimfa, masno telo, svilene žlezde, srednje crevo i epidermis sa kutikulom), na prethodno opisan način.

Izmerena je sveža masa tkiva, a uzorci su potom odlagani u aluminijumske posude od 50  $\mu\text{L}$ , hermetički zatvarani i čuvani u frižideru na  $5^{\circ}\text{C}$  do DSC analize, koja je bila urađena u naredna 24 sata.

Referentni uzorak bila je prazna, hermetički zatvorena aluminijumska posuda. Termalni program DSC analize se sastojao iz 4 koraka:

- 1) držanje 1 min na  $30^{\circ}\text{C}$ ;
- 2) hlađenje do  $-40^{\circ}\text{C}$  brzinom od  $5^{\circ}\text{C} / \text{min}$ ;
- 3) držanje 5 min na  $-40^{\circ}\text{C}$ ;
- 4) zagrevanje do  $30^{\circ}\text{C}$  brzinom od  $10^{\circ}\text{C} / \text{min}$ .

Dobijene termalne krive (Slika 18) su analizirane korišćenjem programa Pyris Software (Perkin Elmer, verzija 10.1.0.0412).

Nakon analize, aluminijumske posude su otvarane bušenjem i sušene na  $60^{\circ}\text{C}$  u toku 72 časa do postizanja konstante suve mase tkiva. Ukupna količina vode dobijena je gravimetrijski iz razlike u masi tkiva pre i posle sušenja, kako je opisano u poglavlju *Gravimetrijsko određivanje sadržaja vode*.

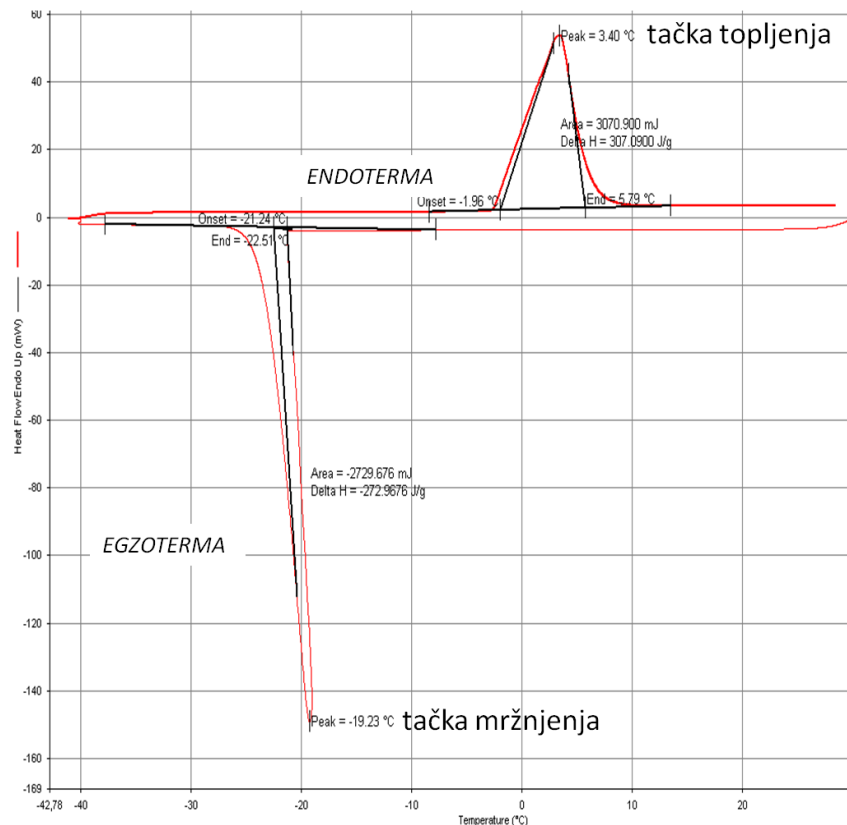
Sa termalnih kriva (Slika 18) očitane su:

- a) tačka mržnjenja (*engl.* supercooling point),
- b) tačka topljenja (*engl.* melting point),
- c) entalpija mržnjenja ( $\Delta H_c$ ) i
- d) entalpija topljenja ( $\Delta H_m$ ).

Količina osmotski aktivne (slobodne) vode (OA) dobijena je deljenjem entalpije topljenja ( $\Delta H_m$ ) uzorka sa standardnom entalpijom topljenja leda ( $334,5 \text{ Jg}^{-1}$ ):

$$OA [\text{mg}] = \frac{\Delta H_m [\text{mJ}]}{334,5 [\text{Jg}^{-1}]}$$

Količina osmotski neaktivne (vezane) vode (OI) dobijena je oduzimanjem sadržaja slobodne (OA) vode od ukupne vode u uzorku.



**Slika 18.** Termalna kriva destilovane vode (Ž. Popović, avgust 2011).

Sadržaji ukupne, OA i OI vode u tkivima izražavani su po suvoj masi tkiva, što predstavlja meru hidriranosti tkiva:

$$\text{hidriranost} \left[ \frac{\text{mg}}{\text{mg}} \right] = \frac{\text{voda (TW, OA, OI)}}{DW}$$

gde su:

- TW/OA/OI – ukupna, osmotski aktivna i neaktivna voda,
- DW – suva masa.

### 3.4.3 Određivanje osmolalnosti hemolimfe

Za određivanje osmolalnosti hemolimfe korišćen je osmometar Vapro 5520 (Wescor, SAD). Uređaj je uključen, kalibrisan i ostavljen na ekvilibrisanje na sobnoj temperaturi 24h pre analize.

Na prethodno opisan način, sveže uzorkovana hemolimfa insekata (5  $\mu\text{L}$ ), pomešana je sa jednako zapreminom standarda od 100 osmola. Smeša uzorka i standarda, ukupne zapremine od 10  $\mu\text{L}$ , nanošena je na papirni tufer koji je postavljan u uređaju za merenje.

Nakon ekvilibracije od 85 sekundi uređaj je merio osmolalnost smeše, na osnovu koje je računata osmolalnost uzorka korišćenjem sledeće formule:

$$Osm \left[ \frac{mOsm}{kg} \right] = \frac{(Osm_{smeše} - 500)}{10}$$

gde su:

- $Osm_{smeše}$  – očitana osmolalnost,
- 500 – osmolalnost standarda dodatog u smešu (5  $\mu\text{L}$  x 100 mOsm),
- 10 – ukupna zapremina nanete smeše ( $\mu\text{L}$ ).

### **3.4.4 Analiza sadržaja pojedinih nukleotida i koenzima metodom kapilarne elektroforeze (CE)**

Za analize sadržaja nukleotida u gusenicama kukuruznog plamenca korišćena je kapilarna elektroforeza (CE, *engl.* capillary electrophoresis) nukleotida. CE pripada elektromigracionim analitičkim tehnikama koje se koriste za razdvajanje različitih vrsta naelektrisanih biomolekula, između ostalih i nukleotida.

Kao i druge elektromigracione tehnike, CE se zasniva na razdvajanju naelektrisanih biomolekula između dva pola električnog izvora, a razlike u kretanju biomolekula su izazvane razlikama u vrsti i količini naelektrisanja po masi, kao i medijumu u kome se razdvajaju. Zbog efekta oslobađanja toplote prilikom prolaska struje kroz provodnik i u elektroforetskim sistemima dolazi do tzv. Džulovog zagrevanja. Međutim, za razliku od standardnih elektroforeza koje imaju problem pregrevanja, kod kapilarne elektroforeze koja se odvija u kapilarama malog dijametra (od 25 do 150  $\mu\text{m}$ ) ispunjenim puferom, oslobađanje toplote je minimalno. Osim toga, zbog veoma povoljnog odnosa površine i zapremine provodnog tela, oslobađanje toplote u CE je brzo, te se čitav sistem izuzetno malo zagreva. Zbog toga, iako nije neophodan, u CE može se koristiti i gel kao razdvajajući medijum.

Kapilarna elektroforeza je brza i pouzdana tehnika koja omogućava da se u 3–20 min teoretski razdvoji 150 000 različitih molekula po jednom metru (Friedecky i dr., 2007). Za razliku od hromatografskih metoda koje imaju veću osetljivost, priprema uzoraka za kapilarnu elektroforezu je jednostavnija, kraća i ekonomski povoljnija. U ovoj studiji je korišćena metoda razdvajanja nukleotida CE koja je detaljno opisana i objavljena od strane Friedecky Davida i saradnika (Friedecky i dr., 2007).

*Priprema uzoraka i rastvora za analizu CE*

Analizirano je tri pula po eksperimentalnoj grupi, pri čemu je 5 gusenica činilo jedan pul. Analiziran je homogenat celih dijavauzirajućih i nedijavauzirajućih gusenica pripremljen na sledeći način: za pripremu grubog homogenata izmerena je sveža masa pet gusenica koje su potom zamrznute u tečnom azotu i usitnjene makazicama za disekciju. Komadići gusenica su dodati u 50 mM fosfatni pufer pH 7,0 i mehanički usitnjeni pomoću poluatomatskog teflonsko-staklenog homogenizera, pri brzini od 1 500 obrta po minuti i 10 ujednačenih udaraca.

Za deproteinaciju uzorka, 100  $\mu$ L grubog homogenata je dodato u vijalu sa 300  $\mu$ L metanola, smeša je snažno mešana 30 s vortex uređajem, a potom i dodatno homogenizovana 3 min u ultrazvučnom kupatilu modela FB15056 (Fischer Scientific, Nemačka). Nakon sonikacije, smeša uzorka i alkohola je centrifugirana 5 min na 10 000 obrtaja/min, a 300  $\mu$ L dobijenog supernatanta je upareno u drugoj vijali do suvog ostatka, pod mlazom azota. Suvi ostatak je rastvoren sa 100  $\mu$ L dejonizovane vode (18,2  $\Omega$ cm, Elga Bucks, UK) i direktno ubrizgavan u kapilaru. Za pravljenje elektrolita i standarda nukleotida korišćena je dejonizovana voda. Limunska kiselina,  $\gamma$ -aminobuterna kiselina (GABA), cetil-trimetil-amonijum bromid (CTAB), kao i standardi nukleotida bili su Sigma (St. Louis, USA), a metanol Fluka (Buchs, Switzerland). Sve hemikalije su bile visoke čistoće, analitičkog kvaliteta.

Razdvajajući elektrolit bio je 40 mM citrat titriran sa GABA do postizanja pH 4,4 nakon čega je dodat i katjonski surfaktant CTAB finalne koncentracije od 8 mM, a ceo rastvor je dobro izmešan u ultrazvučnom kupatilu 15 min. Pravljeni su pojedinačni rastvori standarda (ATP, ADP, AMP, NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>, GTP, GDP, GMP, UDP) u koncentraciji od 5 mg/mL. Osnovna smeša standarda nukleotida koncentracije 1 mg/mL napravljena je mešanjem pojedinačnih rastvora standarda nukleotida, dok su niže koncentracije smeše standarda dobijane razblaživanjem osnovne smeše standarda.

### Aparatura i uslovi razdvajanja

Analize nukleotida su urađene pomoću CE sistema HP 3D Agilent (Waldbronn, Nemačka) sa diodnim detektorom na koloni. Razdvajanje je izvršeno na silikatnoj kapilari (*engl.* fused silica capillary) debljine 75 µm, ukupne dužine 80,5 cm i efektivne dužine od 72 cm (MicroSolv Technology Corporation, NJ, SAD). Kapilara je bila termostatorirana na 25°C, 15 min ispirana sa 0,1 M NaOH, potom 15 min sa dejonizovanom vodom i na kraju sa razdvajajućim elektrolitom na početku svakog radnog dana merenja. Između pojedinačnih uzoraka, kapilara je bila ispirana 1 min sa 0,1 M NaOH, 1 min sa dejonizovanom vodom i 2 min sa razdvajajućim elektrolitom. Talasna dužina na kojoj su detektovani nukleotidi bila je 260 nm. Injektiranje u kapilaru obavljeno je pod pritiskom od 50 mbar/20 sekundi i naponom od -25 kV. Sva merenja su urađena 5 puta.

### Izračunavanja

Količina pojedinačnih nukleotida izražena je po svežoj masi uzorka (masena koncentracija).

Rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

Energetski naboj (EC, *engl.* energy charge), koji predstavlja odnos koncentracije adeninskih nukleotida (ATP, ADP i AMP), računat je pomoću sledeće jednačine:

$$E.C. = \frac{[ATP] + \frac{1}{2} [ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

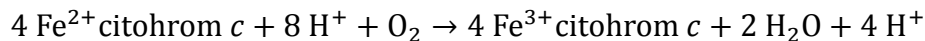
### 3.4.5 Određivanje aktivnosti citohrom c oksidaze u mitohondrijama

#### *Izolacija mitohondrijske frakcije*

Mitohondrije su izolovane iz grubog 20% homogenata celih larvi. Svaka eksperimentalna grupa imala je po tri pula, a svaki pul je činilo 10 larvi. Homogenizacija larvi je izvršena na ledu u hladnom 50 mM fosfatnom puferu pH 7,0 u odnosu 1:4 (v/v) pomoću kombinovanog teflon-staklenog homogenizera pri 1 500 obrtaja i 10 udaraca. Dobijeni 20% grub homogenat je centrifugiran 10 min na 4°C na 1 000 g, kako bi se otklonili grubi ostaci ćelija. Dobijeni supernatant je prenet u nove mikrotube i centrifugiran 20 min na 4°C na 20 000 g radi taloženja mitohondrija. Supernatant je odstranjen, talog mitohondrija ispran hladnim 50 mM fosfatnim puferom pH 7,0 i ponovo centrifugiran 20 min na 4°C na 20 000 g, kako bi se dobila prečišćena mitohondrijska frakcija. Talog mitohondrija je rastvoren u istom fosfatnom puferu u koji je dodata i 0,5 M saharoza i nakon toga je zamrznut u tečnom azotu i ostavljen na - 80°C do dalje analize.

#### *Merenje aktivnosti COX*

Citohrom c oksidaza (COX, *engl.* cytochrome c oxidase, EC 1.9.3.1) je mitohondrijski enzim elektron-transportnog lanca koji katalizuje reakciju potpune redukcije kiseonika do vode:



Aktivnost citohrom c oksidaze određivana je spektrofotometrijski praćenjem oksidacije citohroma c kao pad apsorbance na 550 nm talasne dužine (Hoffmann i Hand, 1990).

#### *Korišćeni reagensi*

0,05 M fosfatni pufer pH 7,0 i 1 mM rastvor redukovano citohroma c.



*Priprema rastvora citohroma c*

Redukcija 1 mM rastvora citohroma *c* izvršena je dodatkom askorbinske kiseline u finalnoj koncentraciji od 5 mM. Višak askorbata iz rastvora sa redukovanim citohromom *c* je uklonjen dijalizom preko noći na 4°C. Uspešnost redukcije citohroma *c* proverena je snimanjem apsorpcionog spektra na spektrofotometru. Dobijeni 1 mM rastvor redukovano citohroma *c* je razliven u manje zapremine i zamrznut na -20°C do daljih analiza. Pre korišćenja u enzimskom eseju kvalitet rastvora redukovano citohroma *c* je proveren snimanjem njegovog spektra.

*Postavka reakcije*

Dodavanjem 5–10 µL uzorka mitohondrijske frakcije u 250 µL smeše pufera i rastvora redukovano citohroma *c* finalne koncentracije 50 µM otpočinje reakcija. Reakcija se prati u toku 10 min spektrofotometrijski, kao pãd apsorbance na 550 nm. Aktivnost COX je merena na mikrotitar ploči sa 96 bunarića korišćenjem spektrofotometra/fluorimetra Infinite M200 (Tecan Group Ltd) u trajanju od 20 min.

*Izračunavanje*

$$COX_{akt} \left[ \frac{mol}{min \cdot mg \cdot prot} \right] = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{sp})}{28 \cdot 10^{-3} \cdot C_{prot} \cdot V_{uz}/V_{rs}}$$

gde su:

- $\Delta A_{uz}$  – promena apsorbance u minuti za uzorak,
- $\Delta A_{sp}$  – promena apsorbance u minuti za slepu probu,
- $C_{pr}$  – koncentracija proteina mg/mL,
- $V_{uz}$  – zapremina uzorka,
- $V_{rs}$  – zapremina reakcione smeše,
- 28 – milimolarni ekstincioni koeficijent redukovano citohroma *c* na 550 nm ( $mM^{-1} \cdot cm^{-1}$ ),
- $10^{-3}$  – prevođenje milimola u mol.

### 3.4.6 Ekspresija gena

#### 3.4.6.1 Odabir sekvenci i dizajn početnica

Odabir genskih sekvenci za analizu ekspresije gena izvršen je na osnovu literaturnih podataka praćenja ekspresije kod drugih vrsta koje ulaze u mirovanje. Lista kandidat gena za praćenje ekspresije u dijapauzi kukuruznog plamenca je sužena na osnovu toga da li u javnim bazama podataka postoje sekvence za te gene kod *O. nubilalis*. Izabrane su sledeće sekvence za praćenje ekspresije gena, a pristupni kôdovi NCBI (*engl.* National Center for Biotechnology Information) navedeni su u zagradi pored naziva sekvence:

1. aktin (EL928709.1),
2. ribozomalni protein s03 (EL929086.1),
3. NADH dehidrogenaza, subjedinica 1 (AF349037.1),
4. KoQ-citohrom *c* oksidoreduktaza, subjedinica 9 (EL928629.1),
5. citohrom *c* oksidaza, subjedinica 1 (EU128659.1),
6. ATP sintaza, subjedinica  $\gamma$  (EL929482.1),
7. ADP/ATP translokaza (EL928491.1),
8. prohibitin 2 (EL930118.1),
9. glutationS-transferaza (EL929278.1),
10. tioredoksin 2 (EL929289.1),
11. glutaredoksin (EL930102.1),
12. metalotionein 3 (EL929052.1),
13. feritin (EL929400.1),
14. Hsp90 (EL929806.1),
15. Hsc70 (EL928755.1),
16. Hsp20.4 (AB568467.1),
17. Hsp20.1 (AB568468.1),
18. Bax inhibitor 1 (EL929324.1),
19. TNF (EL928868.1).

U daljem tekstu, radi jednostavnosti, nazivi odabranih sekvenci *O. nubilalis* su korišćeni bez oznaka subjedinica.

U bazi podataka NCBI postoji oko 18 000 različitih vrsta sekvenci *O. nubilalis*: 15 000 EST, 1 400 nukleotidnih, 1 000 proteinskih, 400 GSS sekvenci (*engl.* genome survey sequence) i oko 20 celih gena (septembar, 2013). Iako *O. nubilalis* ne predstavlja često korišćen model organizam u molekularno-biološkim istraživanjima, broj dostupnih sekvenci je visok. Međutim, kako je najveći deo podataka dobijen u studijama otpornosti ove vrste prema Bt toksinu (*Bacillus thuringiensis*), najveći broj sekvenci nije mogao biti upotrebljen u ovom istraživanju.

Početnice za Q-PCR su dizajnirane na osnovu sekvenci preuzetih iz baze podataka NCBI, a nalaze se u priložima (Tabela 30). Dizajn je urađen pomoću softvera Primer 3 (Rozen i Skaletsky, 2000). Parovi početnica su kupljeni od kompanije Generi Biotech s. r. o (Hradec Králové, Češka republika).

#### **3.4.6.2 Izolacija ukupne RNK**

Ukupna RNK izolovana je iz masnog tela gusenica, glavnog metaboličkog tkiva larvi. Masno telo pet jedinki činilo je jednu skupinu (*engl.* pool), a svaka eksperimentalna grupa imala je tri skupine. Tokom različitih faza dijapauze, disekcijom 5 larvi sakupljeno je zajedničko masno telo svakog uzorka i čuvano zamrznuto na -80°C u 500 µL RNA blue (Top-Bio s.r.o., kat. br. R013), do sledećih koraka u izolaciji RNK.

Nakon sakupljanja masnog tela svih eksperimentalnih grupa pristupljeno je izolaciji ukupne RNK.

*Korišćeni reagensi:*

- RNA blue reagens (Top-Bio, Češka republika),
- hloroform (Sigma, kat. br. C2432),
- izopropanol (Penta, kat. br. 603-117-00-0),
- etanol (Penta, kat. br. CAS64-175),
- voda sa 0,05% DEPC (dietil-pirokarbonat, D5758).

*Ukupna RNK je izolovana po sledećim koracima:*

- ❖ tkivo je homogenizovano u 500  $\mu$ L RNA blue reagensa u trajanju od 30 s pomoću ručnog elektičnog homogenizera uz korišćenje čistih sterilnih nastavaka za homogenizaciju;
- ❖ u homogenat je dodato još 500  $\mu$ L RNA blue, a smeša izmešana pipetom;
- ❖ ostavljeno 10 min na sobnoj temperaturi, svakih 2–4 min mešano 5 s vorteks aparatom;
- ❖ homogenat je centrifugiran 10 min na 15 000 g i 4°C i supernatant je prenet u novu mikrotubu od 1,5 mL;
- ❖ u supernatant svakog uzorka je dodato po 200  $\mu$ L hloroforma i smeša je snažno mešana ručno po 15 s dva puta;
- ❖ uzorci su ostavljeni 5 min na sobnoj temperaturi, a potom centrifugirani na 10 min na 15 000 g i 4°C radi razdvajanja hidrofobne i hidrofilne frakcije;
- ❖ nakon centrifugiranja, 400  $\mu$ L gornje bezbojne vodene faze pažljivo je preneto u novu mikrotubu i dodato 400  $\mu$ L izopropanola;
- ❖ smeša je pola sata ostavljena na ledu, a potom je centrifugirana 20 minuta na 20 000 g na 4°C, radi taloženja RNK;
- ❖ iz mikrotube sa istaloženom RNK pipetom je pažljivo dekantovan supernatant;
- ❖ talog ukupne RNK je ispran sa 500  $\mu$ L hladnog (-20°C) 75% etanola rastvorenog u DEPC vodi, uz lagano mešanje okretanjem mikrotube;
- ❖ RNK je ponovo istaložena centrifugiranjem 20 min na 20 000 g i 4°C;
- ❖ supernatant je pažljivo uklonjen, a talog RNK ostavljen 5–6 min na vazduhu da se osuši;
- ❖ talog ukupne RNK je rastvoren u 11  $\mu$ L sterilne DEPC vode;
- ❖ 1  $\mu$ L rastvora ukupne RNK je korišćen za određivanje koncentracije RNK, a 10  $\mu$ L za dalje analize.

### 3.4.6.3 Procena čistoće i kvaliteta uzoraka RNK

Koncentracija i čistoća RNK su izmerene spektrofotometrijski pomoću uređaja Nanodrop 2000 (Thermo Scientific), merenjem apsorbance 1 µL uzorka ukupne RNK na talasnim dužinama od 260 nm, 280 nm i 230 nm.

Na osnovu dobijene apsorbance i uz korišćenje sledeće formule određena je koncentracija ukupne RNK:

$$RNK \left[ \frac{\mu g}{\mu l} \right] = A_{260} \cdot R \cdot F$$

gde su:

$A_{260}$  – apsorbanca uzorka na 260 nm,

R – razblaženje,

F – 40 (1 OD (*engl.* optical density) odgovara vrednosti od 40 µg/µL RNK).

Nakon određivanja koncentracije ukupne RNK, koncentracija svih uzoraka je izjednačena na 1 µg RNK/1 µL DEPC vode dodatkom odgovarajuće količine sterilne DEPC vode.

Provera kvaliteta ukupne RNK urađena je na 2% agaroznom gelu pripremljenom na sledeći način:

- ❖ 1 g agaroze (PEQ Lab, kat. br. 209163) je rastvoren u 50 mL tris-acetatnog (TAE) pufera pH 8,0 sa EDTA i rastvor je zagrevan do ključanja;
- ❖ rastvor otopljene agaroze je ohlađen i u njega je dodato 1,5 µL Midori Green fluorescentne boje (NIPPON Genetics, kat. br MG02);
- ❖ rastvor je blago promešan da se boja ravnomerno rasporedi i izliven je u kalup za gel;
- ❖ nakon 30 min, kada je agarozna očvrsla, gel je ispran sa TEA puferom kako bi se uklonile nečistoće i višak boje sa površine;
- ❖ gel je najmanje 30 min pre razdvajanja potopljen u kadnicu za elektroforezu napunjenu TAE puferom radi ekvilibrisanja gela i pufera.

Za razdvajanje je korišćen mini sistem za horizontalnu agaroznu elektroforezu Mupid-21 (Advance Co. Ltd, Tokio, Japan). Uzorci i RNK markeri RNA Ladde, raspona od 0,24 do 9,5 kb (Invitrogen, kat. br. 15620–016), pomešani su sa puferom za nanošenje i naneti su u bunariće gela. Razdvajanje je prvih 5 min izvođeno na 50V, a potom, nakon potvrde migracije uzoraka u gel, narednih 20–30 min voltaža je povećana na 100 V.

#### 3.4.6.4 *Sinteza komplementarne DNK*

Za sintezu komplementarne DNK (cDNA, *engl.* complementary DNA), u reakciji reverzne transkripcije (RT-PCR) korišćeno je po 5 µg ukupne RNK svakog uzorka. Za postavku RT reakcije korišćene su komponente komercijalnog kompleta Reverse Transcription System (Promega, kat. br. A3500), u skladu sa uputstvima proizvođača. Reakcija sinteze cDNK je izvršena pomoću uređaja T3000 Thermocycler (Biometra; Nemačka) prema sledećem protokolu:

- 5 µg ukupne RNK je zagrevano 5 min na 70°C;
- reakcija reverzne transkripcije (RT), za sintezu komplementarne DNK (cDNK), postavljena je mešanjem sledećih komponenti reakcije:

1.	10x pufer	2	µL
2.	dNTP miks	2	µL
3.	Rnazin	0,5	µL
4.	AMV RT	0,8	µL
5.	Oligo (dT)	1	µL
6.	RNK matrica	5	µL
7.	DEPC voda	4,7	µL
Ukupna zapremina PCR smeše:		20,0	µL

- nakon mešanja svih komponenti, mikrotuba sa reakcionom smešom je inkubirana 45 min na 42°C, radi sinteze komplementarne DNK;
- RT-PCR reakcija je zaustavljena zagrevanjem smeše 5 min na 95°C, radi inaktivacije reverzne transkriptaze;
- mikrotube su potom ohlađene 5 min na ledu.

Novosintetisana cDNK je razblažena 10 puta ultračistom sterilnom vodom za PCR i zamrznuta na -20°C do upotrebe u PCR analizama.

### 3.4.6.5 Kvantitativni PCR (Q-PCR)

Kvantifikacija iRNK odabranih gena urađena je Q-PCR metodom na uređaju CFX96 Real-Time PCR System (BIO-RAD, SAD), a za praćenje umnožavanja DNK u realnom vremenu korišćena je smeša IQ SYBR Green Supermix (BIO-RAD, kat. br. 20371A).

Specifičnost i efikasnost korišćenih početnica testirana je Q-PCR metodom pod istim uslovima PCR reakcije, pod kojima je praćena i količina iRNK odabranih gena. Svaki par početnica testiran je pomoću serije od četiri razblaženja cDNK ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ) i u duplikatu (tehnički replikat).

Jedna Q-PCR reakcija, ukupne zapremine 20  $\mu$ L, pripremana je na sledeći način:

1. IQ SYBR Green Supermix (BIO-RAD, kat. br. 20371A)	10 $\mu$ L
2. Nuclease-free vode (Promega, kat. br. 29325401)	4,2 $\mu$ L
3. leva početnica (10 $\mu$ M)	0,4 $\mu$ L
4. desna početnica (10 $\mu$ M)	0,4 $\mu$ L
5. cDNK	5 $\mu$ L

Nakon mešanja svih komponenti, Q-PCR je izvođen prema sledećem termalnom programu:

1. 95°C/3 min,
2. 94°C/15 s,
3. 60°C/30 s,
4. 72°C/30 s, vrati se na korak 2 40 puta,
5. 55–95°C (snimanje krive topljenja).

Radi provere specifičnosti Q-PCR reakcija, kriva topljenja svake reakcije snimana je u opsegu temperatura od 65°C do 95°C i pri brzini zagrevanja od 0,5°C/ 5 s. Pre Q-PCR analize odabranih gena, praćena je ekspresija gena za aktin i ribozomalni protein s03, kako bi se proverila mogućnost korišćenja ovih gena kao referentnih gena (*engl.* reference gene), na osnovu kojih bi bila računata relativna ekspresija odabranih gena. Nedijapauzirajuća grupa je odabrana za kontrolnu grupu, u odnosu na koju je računata relativna ekspresija ostalih eksperimentalnih grupa.

#### **3.4.6.6 Obrada rezultata kvantitativnog PCR-a**

Q-PCR analizom su dobijene Ct (*engl.* cycle treshold) vrednosti za sve analizirane gene, koje su potom korišćene u računanju relativne ekspresije pomoću REST programa, *engl.* Relative Expression Software Tool (metoda po Pfaffl, 2001; Pfaffl i dr., 2002).

Za računanje relativne ekspresije gena u REST program se unose Ct vrednosti i efikasnost početnica za sve analizirane gene i porede se sa kontrolnom grupom i u odnosu na ekspresiju referentnih gena (aktina i *rps03*). ND eksperimentalna grupa je izabrana za kontrolnu grupu, a njena ekspresija je normalizovana na vrednost 1 (100%) dok je ekspresija ostalih gena poređena sa ekspresijom ND grupe.

Dobijene vrednosti relativne ekspresije su logaritmovane za osnovu dva i prikazane su grafički i tabelarno.



### 3.4.7 Fluorescentna mikroskopija

Za proveru postojanja morfoloških apoptotskih promena u larvalnim tkivima tokom dijapauze korišćena je fluorescentna DAPI boja, odnosno 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidrohlorid (SIGMA, kat. br 32670).

DAPI boja lako prodire kroz ćelijske membrane, posebno kod apoptotskih ćelija. U ćeliji, DAPI se vezuje za mali žljeb dvolančanog DNK molekula, preferirajući AT bogate regione, i formira stabilan kompleks koji fluorescira 20 puta više od nevezane DAPI boje. Kada je boja vezana, kompleks dvolančana DNK-DAPI ima maksimum apsorpcije na 358 nm (UV), a emituje svetlost najviše na 461 nm (plavi deo spektra). DAPI se vezuje i za RNK molekule, ali je fluorescencija mnogo manja i emisija je pomerena na oko 500 nm.

*Tkiva larvi (masno telo, epidermis, mišići, svilene žlezde) pripremljena su za fluorescentnu mikroskopiju na sledeći način:*

- ❖ *ex vivo* materijal je postavljen na čisto predmetno staklo;
- ❖ tkivo je dva puta isprano 50 mM fosfatnim puferom pH 7,2;
- ❖ višak pufera je uklonjen sa tkiva finim papirnim tuferom;
- ❖ tkiva su prelivana sa 5–10 µL DAPI boje(2 mg/mL);
- ❖ inkubacija je trajala 30 min u apsolutnom mraku;
- ❖ tkivo je isprano sa 50 mM fosfatnim puferom pH 7,2 radi uklanjanja viška DAPI boje, a zatim je postavljeno pokrovno staklo;
- ❖ svaki preparat tkiva je umotan u aluminijumsku foliju pre nošenja na posmatranje pod fluorescentnim mikroskopom, Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss, Jena, Nemačka), opremljenim sa CCD kamerom;
- ❖ uzorci su posmatrani pod uvećanjem od 10, 20 i 40 puta.

### 3.4.8 Određivanje fragmentisanosti genomske DNK

Tokom apoptoze dolazi do fragmentacije DNK usled aktivacije DNK nukleaza (DNaza). Radi utvrđivanja da li dolazi do fragmentacije genomske DNK u toku dijapauze urađen je esej fragmentisanosti DNK (*engl.* DNA laddering assay).

Ukupna DNK celih larvi i lutki, kao kontrolne grupe, izolovana je klasičnom metodom pomoću fenol-hloroform smeše (PCI, *engl.* Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol).

*Korišćeni reagensi:*

- ekstrakcioni puffer (Lifton pufer): 0,1 M Tris, 0,2 M saharoza, 0,05 M EDTA, 0,5% SDS, pH 9,0,
- proteinaza K finalne koncentracije 50–60 µg/mL,
- 5 M kalijum acetat pH 7,5,
- fenol:hloroform:izoamil alkohol, PCI smeša (25:24:1, v/v), pH of 8,0,
- TE pufer pH 7,4 (10 mM Tris-HCl, pH 7,4 i 1 mM EDTA, pH 8,0),
- RNaza A (Sigma, R6513),

*Protokol za izolaciju:*

1. 5 larvi/lutki, koje čine jednu skupinu (pul), su usitnjene u zamrznutom stanju laboratorijskim makazicama pre homogenizacije;
2. homogenizacija tučkom i avanom je izvršena u hladnom ekstrakcionom puferu koji je dodat u 3 puta većoj zapremini u odnosu na masu tkiva;
3. u grub homogenat dodata je proteinaza K (10 mg/mL) u odnosu 1:50 (v/v) i uzorak je inkubiran preko noći na 65°C u vodenom kupatilu;
4. nakon tretmana proteinazom K, u uzorak je dodat 5 M kalijum acetat u odnosu 1:10 (v/v), uzorak je dobro izmešan i inkubiran na ledu 30 min;
5. posle inkubacije uzorci su centrifugirani 10 min na 10 000 obrt/min, nakon čega je supernatant prenet u novu tubicu;
6. dodata je ista zapremina PCI smeše;
7. uzorci su izmešani snažnim mućkanjem nekoliko puta;

8. mikrotube su centrifugirane 5 min na 5 000 obrt/min;
9. gornja, vodena faza, bogata nukleinskim kiselinama je prenetu u novu mikrotubu i dodat je hloroform u odnosu 1:1, a mikrotube su izmešane nekoliko puta;
10. uzorak je centrifugiran 5 min na 5 000 obrt/min, a gornja, vodena faza je prenetu u novu mikrotubu;
11. radi taloženja DNK dodat je ledeno-hladan 100% EtOH u dvostruko većoj zapremini, mikrotuba je nekoliko puta izmešana obrtanjem i ostavljena najmanje 10 min na -20°C;
12. talog DNK je dobijen centrifugiranjem 5 min na 15 000 obrt/min;
13. višak etanola je uklonjen pipetom;
14. talog DNK je rastvoren u 0,5 mL TE pufera i u rastvor DNK dodato je 0,3 mL 5M amonijum acetata i 1 mL 100% EtOH radi i prečišćavanja;
15. smeša je ostavljena na -20°C najmanje 10 min i potom su mikrotube centrifugirane na 15 000 obrt/min;
16. supernatant je u potpunosti uklonjen, a talog DNK rastvoren u TE puferu.

Nakon izolacije DNK, uzorci su tretirani RNazom A 2h na 37°C kako bi se uklonio višak ukupne RNK u uzorcima, a potom su RNaze inaktivirane inkubacijom 5 min na 70°C. Prečišćavanje i taloženje DNK je ponovljeno od koraka br. 14, talog DNK je rastvoren u TE, a koncentracija DNK je određena na spektrofotometru na isti način na koji je određivana i koncentracija ukupne RNK, sem što je F faktor za DNK 50.

Za pozitivnu kontrolu eseja ukupna DNK larvi je tretirana ultrazvukom 5 min, a potom su svi uzorci ukupne DNK (1,5 µg) razdvojeni na 2% agaroznom gelu napravljenom prema već opisanim uputstvima (videti poglavlje *Procena čistoće i kvaliteta uzoraka RNK*).

### 3.4.9 Određivanje aktivnosti kaspaza

Aktivnost kaspaza određivana je fluorimetrijski u citosolnoj frakciji homogenata celih gusenica i lutki i u homogenatu različitih tkiva, a prema protokolima opisanim u radu Menze i Hand (2007). Korišćeni su specifični fluorescirajući supstrati za humane kaspaze – kaspazu 9, kaspazu 8 i kaspazu 3.

Za pozitivnu kontrolu merenja aktivnosti kaspaza odabrane su lutke nedijapauzirajuće generacije, jer je poznato da se tokom metamorfoze odvijaju intenzivni procesi programirane ćelijske smrti tokom kojih dolazi do remodelovanja larvalnih tkiva u adulta.

Kako bi se utvrdilo da li se procesi apoptoze događaju i u aktivnom razvoju i u dormanciji (dijapauzi), za merenje aktivnosti kaspazama sličnih enzima u analizama su korišćene nedijapauzirajuće (ND) i dijapauzirajuće gusenice (grupe D2t i D2). Aktivnost je merena u homogenatima celih tela, ali i u homogenatima larvalnih tkiva (masno telo, svilene žlezde, srednje crevo i epidermis sa kutikulom).

#### *Homogenizacija i razdvajanje ćelijskih frakcija*

Prilikom analize svaka eksperimentalna grupa je imala po tri pula. Za pripremu homogenata jednog pula korišćen je materijal sakupljen od 5 celih gusenica i lutki, dok je za različita tkiva jedan pul bio sačinjen od 10 disekovanih gusenica.

Uzorci tkiva su prvo tretirani 5 min ultrazvukom u vodenom kupatilu sa ledom. Homogenizacija je izvršena na ledu automatskim homogenizerom sa teflonskim staklom (1 500 obrtaja/min, 10 pasaža) u 1,5 mL hladnog pufera za homogenizaciju (0,25 M saharoza, 2 mM EGTA, 3,4 mM MOPS i 0,05% tiourea).

Grub homogenat tkiva, celih lutki i larvi prenet je u mikrotubu od 1,5/2 mL. Kako bi se uklonile ćelijske membrane i ostali krupniji ostaci, grubi homogenati su centrifugirani 10 min na 5 000 g i 4°C. Nakon centrifugiranja supernatant je pažljivo prenesen u nove mikrotube od 1,5 mL pipetom od 200 µL, izbegavajući lipide koji su se izdvojili na površini.

Radi taloženja mitohondrija, prečišćen homogenat je centrifugiran 5 min na 4°C na 20 000 g, a supernatant (citosol sa ostacima ćelijskih komponenti, u daljem tekstu citosolna frakcija) je prenet u nove mikrotube od 1,5 mL i čuvan na ledu do koraka odsoljavanja. Talog mitohondrija je pažljivo rastvoren u 200 µL ledenog 20 mM Tris-HCl pH 7,5 (Trizma baza, Sigma-Aldrich, Inc., kat. br. T-1503 i HCl, Lachema) i čuvan na -80°C do dalje upotrebe.

#### *Odsoljavanje citosolne frakcije*

Pre merenja aktivnosti kaspaza, citosolne frakcije homogenata su odsoljene upotrebom ZebaSpin kolona (Thermo Scientific, kat. br. 89889).

Pre odsoljavanja, rastvor za čuvanje kolone odstranjen je centrifugiranjem 2 min na 1 000 g. Nakon toga, kolona je postavljena u novu epruvetu od 15 mL i na centar kompaktne smole kolone je pažljivo nanet uzorak i postupak centrifugiranja je ponovljen, radi dobijanja odsoljene citosolne frakcije.

Nakon merenja koncentracije proteina u odsoljenoj citosolnoj frakciji, dodat je koktel inhibitora proteaza (Mini EDTA-free, Roche Applied Science, kat. br. 11 836 170 001) i 2x koncentrovan pufer za supstrate kaspaza. Koncentracija ukupnih proteina u odsoljenim citosolnim frakcijama izmerena je pomoću kompleta (Bradford Quick Start assay, BIO-RAD, kat. br. 1-800-424-6723) prema uputstvima proizvođača za mikroesej protokol, uz korišćenje gama globulina kao standarda. Koncentracija proteina u uzorcima izračunata je na osnovu standardne krive, korišćenjem parametara linearne regresije.

Uzorci tkiva, radi povećanja koncentracije proteina, koncentrovani su pomoću kolona (Microcon, Millipore, YM-50, kat. br. 42415, cut-off 50 kDa). Kolona je postavljena u mikrotubu od 1,5 mL, nanošeno je do 500 µL uzorka i zajedno centrifugirano 25 min na 14 000 g i 4°C, kako bi se uklonio višak rastvora. Nakon toga, kolona na kojoj je zadržan uzorak je postavljena u obrnutom položaju u novu mikroeprevetu od 1,5 mL i centrifugirana 3 min na 1 000 g, kako bi se eluirao koncentrovan uzorak.

Nakon sakupljanja koncentrovanog uzorka citosolne frakcije tkiva, merenje koncentracije proteina Bradfordovom metodom je ponovljeno. Koncentracija proteina je podešena na 1,5 mg/mL dodavanjem pufera za kaspaze.

#### *Fluorimetrijsko određivanje aktivnosti kaspaza*

Fluorimetrija je spektrohemijska metoda analize u kojoj se molekuli analizirane supstance pobuđuju svetlošću određene talasne dužine, nakon čega one emituju svetlost druge talasne dužine. Emisioni spektar svake supstance je karakterističan i koristi se za kvalitativne i kvantitativne analize. Za fluorimetrijsko određivanje aktivnosti enzima najčešće se koriste supstrati kod kojih se dejstvom enzima odvaja fluorescentni produkt, a intenzitet fluorescencije srazmeran je aktivnosti enzima.

Fluorimetrijski esej za kaspazu 9 zasnovan je na hidrolizi peptidnog supstrata N-acetil-Leu-Glu-His-Asp-7-amino-4-trifluorometil kumarina (Ac-LEHD-AFC) (Sigma-Aldrich, Inc. kat. br. A 5845), što dovodi do oslobađanja fluorescentnog produkta – 7-amino-4-trifluorometil kumarina (AFC). Ekscitirajuća i emitujuća talasna dužina AFC su na 400 nm, odnosno 505 nm.

Esej za kaspazu 8 zasnovan je na njenoj sposobnosti da hidrolizuje peptidni supstrat acetil-Ile-Glu-Thr-Asp-7-amino-4-metil kumarina (Ac-IETD-AMC) (Sigma-Aldrich, Inc. kat. br. A 4188), što dovodi do oslobađanja fluorescentnog produkta – 7-amino-metilkumarina (AMC). Ekscitirajuća i emitujuća talasna dužina AMC su 360 nm, odnosno 440 nm.

Esej za kaspazu 3 zasnovan je na njenoj sposobnosti da hidrolizuje peptidni supstrat acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-metilkumarin (Ac-DEVD-AMC) (Sigma-Aldrich, Inc. kat. br. A 1086), što dovodi do oslobađanja fluorescentnog produkta – 7-amino-4-metilkumarina (AMC). Ekscitirajuća i emitujuća talasna dužina AMC su 360 nm, odnosno 460 nm.

Supstrati su rastvoreni u puferu za kaspaze:

- 0,5 M saharoza (Lachema, kat. br. 15547515),
- 10 mM DTT (Promega, kat. br. v3155),
- 0,1% CHAPS (Sigma-Aldrich, Inc. kat. br. 226974),
- 2 mM EDTA (Serva, kat. br. 11280),
- 20 mM HEPES-Tris pH 7,5 (Sigma-Aldrich, Inc. HEPES, kat. br. H3375; Tris, kat. br. T-1503).

Finalna koncentracija supstrata za kaspaze 9 i 3 bila je 100  $\mu\text{M}$ , a za kaspazu 8 bila je 50  $\mu\text{M}$ . Zapremina konačne reakcije smeše svih kaspaza bila je 100  $\mu\text{L}$ . Aktivnost kaspaza je merena u različitim intervalima do 120 min na mikrotitar ploči sa 96 bunarića i na fluorimetru marke Infinite M200 (Tecan Group Ltd) korišćenjem odgovarajućih ekscitirajućih i emitujućih talasnih dužina.

Aktivnost kaspaza izračunata je pomoću sledeće jednačine:

$$\text{Specifična aktivnost } [\Delta F \text{ mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}] = \frac{\Delta F}{[\text{prot}] \cdot t}$$

gde su:

- $\Delta F$  – promena intenziteta fluorescencije od početne ( $F_0$ ) do krajnje ( $F$ ) tačke vremenskog intervala merenja,
- $[\text{prot}]$  – koncentracija ukupnih proteina u uzorku  $[\text{mg/mL}]$ ,
- $t$  – ukupno vreme merenja.

S obzirom na to da kod *O. nubilalis* nisu opisane kaspaze, a da su korišćeni supstrati za sisarske kaspaze 9, 8 i 3, a imajući u vidu postojanje homologa ovih enzima kod insekata, umesto termina „kaspaza” u daljem tekstu koristiće se termin „kaspazi slična aktivnost”, jer se ne može sa sigurnošću tvrditi da li se radi o jednom ili, verovatnije, većem broju homologih enzima.

Takođe, zbog toga što nisu bili korišćeni standardi fluorescentnih supstrata i prečišćeni enzimi na osnovu čije aktivnosti bi se konstruisale standardne krive, aktivnost insekatskih kaspaza je izražena u odnosu na koncentraciju proteina.

Kako bi se dobio što bolji uvid u rezultate, aktivnost enzima svake eksperimentalne grupe je upoređena sa aktivnošću enzima u kontrolnoj grupi (lutke), čija aktivnost je uzeta kao 100%. Na ovaj način dobijene su relativne aktivnosti „kaspazama sličnih enzima“ u različitim eksperimentalnim uslovima.

### **3.5 Statistička obrada podataka**

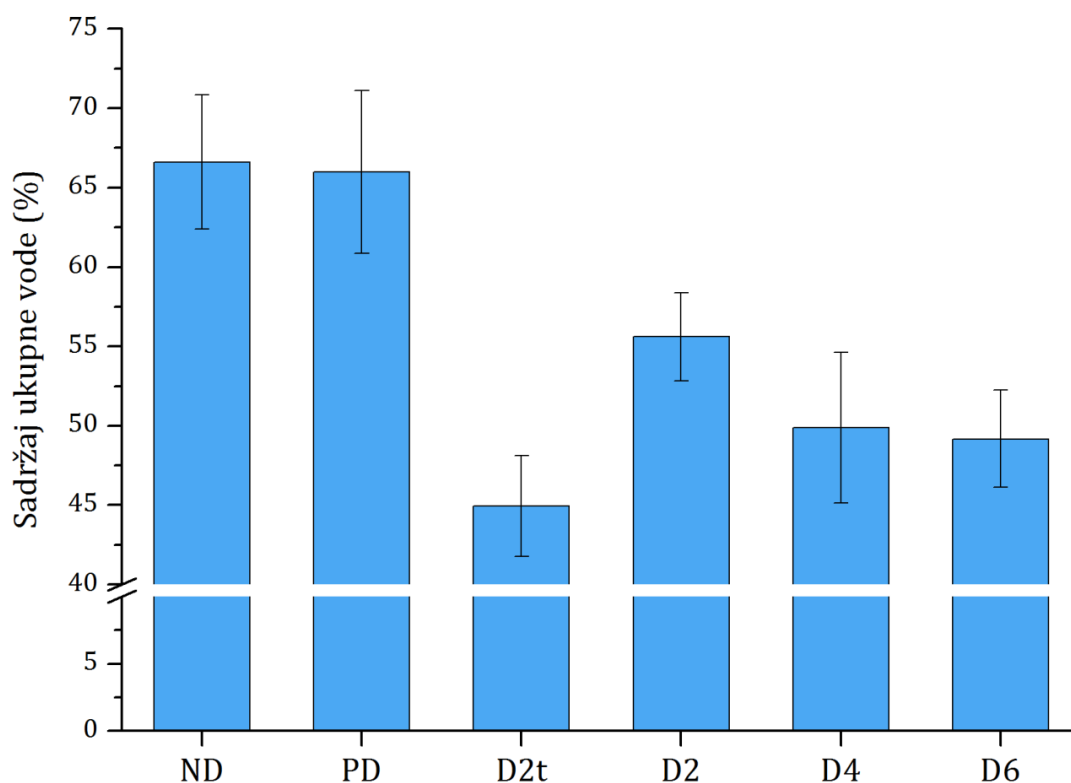
Statistička obrada dobijenih rezultata urađena je u programu Origin Pro verzija 8.0 (OriginLab, Northampton, MA). Razlika između dobijenih vrednosti ispitivanih parametara eksperimentalnih grupa testirana je jednofaktorskom ili dvofaktorskom analizom varijansi (ANOVA) i *post hoc* Bonferonijevim testom (*it.* Bonferroni) za nivo značajnosti od  $p < 0,05$ . Rezultati su prikazani tabelarno i grafički.



## **4. REZULTATI**

#### 4.1 Sadržaj ukupne vode

Gravimetrijski izmerena količina ukupne vode u larvama se razlikuje između eksperimentalnih grupa. Količina vode je najveća kod nedijapauzirajućih (ND) i predijapauzirajućih (PD) i kreće se od 60% do 70%. Sadržaj vode je niži kod dijapauzirajućih larvi i zavisi kako od dužine trajanja dijapauze, tako i od temperature na kojoj su larve aklimatizovane (Grafik 1).



**Grafik 1.** Sadržaj ukupne vode u celom telu larvi *O. nubilalis*. Rezultati su izraženi u procentima kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška dobijeni od 10 larvi iz svake eksperimentalne grupe.

U larvama koje su u dijapauzi na nižoj temperaturi (D2, D4, D6) može se uočiti postepeno smanjenje količine telesne vode tokom trajanja dijapauze (Grafik 1). Sa druge strane, u larvama koje su bile 2 meseca u dijapauzi na višoj temperaturi

(D2t) izmeren je najmanji sadržaj vode (45%), manji i u odnosu na količinu vode izmerenu u larvama iste starosti na 5°C (D2 grupa).

Statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ , Bonferonijev test) između eksperimentalnih grupa prikazane su u Tabeli 6, dok su srednje vrednosti i standardne greške prikazane u Tabeli 31 u Prilozima.

**Tabela 6.** Sadržaj ukupne vode u celom telu larvi *O. nubilalis* – jednofaktorska ANOVA i *post hoc* Bonferonijev test za nivo značajnosti od  $p < 0,05$  (1 – značajno, 0 – nije statistički značajno).

	ND	PD	D2t	D2	D4	D6
ND		0	1	1	1	1
PD			1	1	1	1
D2t				1	0	0
D2					1	1
D4						0
D6						

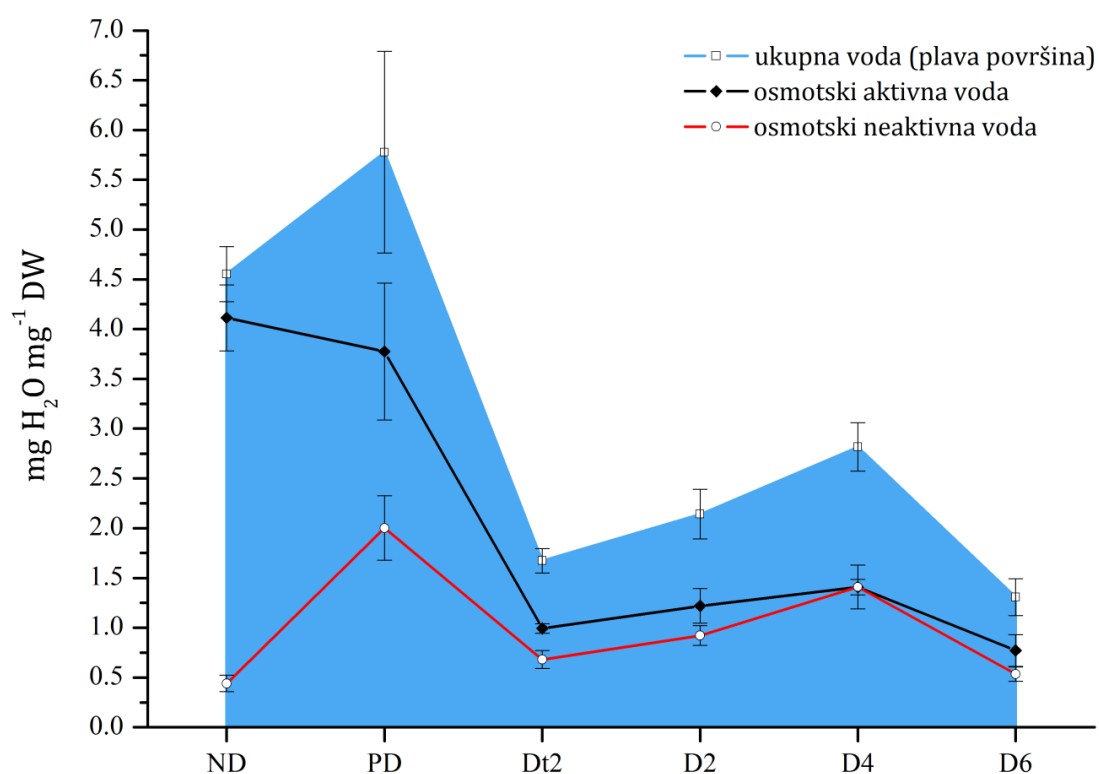
## 4.2 Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija i osmometrija

Diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom snimane su termalne krive različitih tkiva gusenica. Reprezentativni primeri dve termalne krive hemolimfe nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih larvi nalazi se u Prilozima (Slika 23).

### 4.2.1 Sadržaj ukupne, osmotski aktivne i neaktivne vode u odabranim tkivima gusenica

#### 4.2.1.1 Hemolimfa

Sadržaj ukupne, osmotski aktivne i neaktivne vode u hemolimfi se razlikuje između eksperimentalnih grupa (Grafik 2).



**Grafik 2.** Sadržaj ukupne, osmotski aktivne i osmotski neaktivne vode u hemolimfi larvi *O. nubilalis*. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost sadržaja vode ± standardna greška dobijena za 5 uzoraka po svakoj eksperimentalnoj grupi (DW – suva masa).

Sadržaj ukupne i OA vode u hemolimfi je manji kod većine dijapauzirajućih grupa (D2t, D2 i D6) u odnosu na nedijapauzirajuće i predijapauzirajuće. Količina ukupne i OI vode varira tokom dijapauze na niskoj temperaturi (D2, D4, D6) – njen sadržaj raste sredinom dijapauze (D4), usled porasta količine osmotski neaktivne vode i stagniranja količine osmotski aktivne vode, da bi potom krajem dijapauze opao.

Sadržaj vode se ne razlikuje statistički značajno u hemolimfi gusenica koje su isti vremenski period u dijapauzi (D2t i D2), ali na različitim temperaturama (22°C i 5°C).

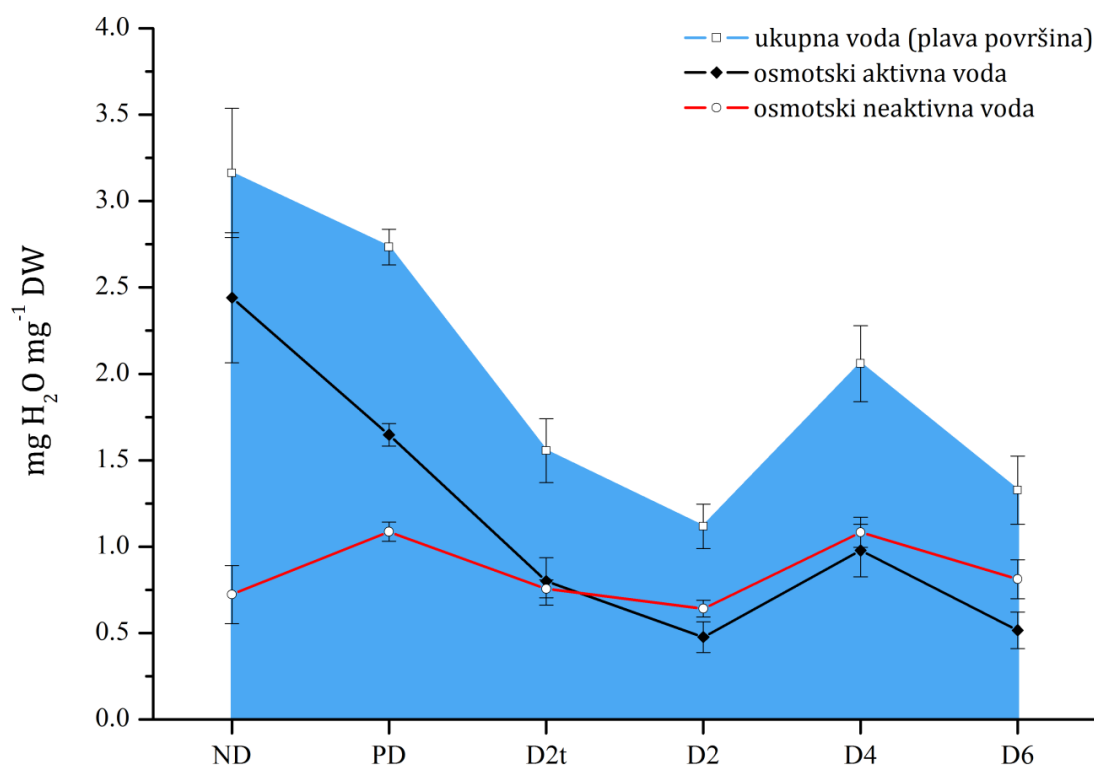
Statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ , Bonferonijev test) između eksperimentalnih grupa prikazane su u Tabeli 7, dok su srednje vrednosti i standardne greške prikazane u Tabeli 31 u Prilozima.

**Tabela 7.** Sadržaj ukupne (a), sadržaj osmotski aktivne (b) i sadržaj osmotski neaktivne vode (c) u hemolimfi larvi *O. nubilalis* – jednofaktorska ANOVA i *post hoc* Bonferonijev test za nivo značajnosti od  $p < 0,05$  (1 – značajno, 0 – nije statistički značajno).

a) ukupna voda							b) osmotski aktivna							c) osmotski neaktivna						
	ND	PD	D2t	D2	D4	D6		ND	PD	D2t	D2	D4	D6		ND	PD	D2t	D2	D4	D6
ND		0	1	1	1	1	ND		0	1	1	1	1	ND		1	0	0	1	0
PD			1	1	1	1	PD			1	1	1	1	PD			1	1	0	1
D2t				0	1	0	D2t				0	0	0	D2t				0	0	0
D2					0	0	D2					0	0	D2					0	0
D4						0	D4						0	D4						1
D6							D6							D6						

#### 4.2.1.2 Srednje crevo

Sadržaj ukupne, osmotski aktivne i neaktivne vode u srednjem crevu se razlikuje između eksperimentalnih grupa (Grafik 3). Najveća količina ukupne i osmotski aktivne vode izmerena je kod nedijapauzirajućih i predijapauzirajućih gusenica.



**Grafik 3.** Sadržaj ukupne, osmotski aktivne i osmotski neaktivne vode u srednjem crevu larvi *O. nubilalis*. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost sadržaja vode ± standardna greška dobijena za 5 uzoraka po svakoj eksperimentalnoj grupi (DW – suva masa).

Sadržaj vode u srednjem crevu dijavauzirajućih larvi zavisi kako od dužine trajanja dijavauze, tako i od temperature na kojoj su larve odgajane (Grafik 3). Sadržaj vode je veći u larvama koje su dva meseca u dijavauzi na sobnoj temperaturi (D2t), u odnosu na larve koje su isti vremenski period u dijavauzi, ali na 5°C (D2). Takođe,

sadržaj vode u srednjem crevu menja se i tokom trajanja dijapauze – raste do polovine dijapauze (D4), a potom opada (D6).

Količina osmotski neaktivne vode ne razlikuje se značajno između većine grupa, sem u dijapauzi na niskoj temperaturi (D2-D6). Naime, osmotski neaktivna voda se značajno povećava početkom dijapauze (D2) u odnosu na predijapauzu (PD), i sredinom dijapauze (D4) u odnosu na početak dijapauze (D2).

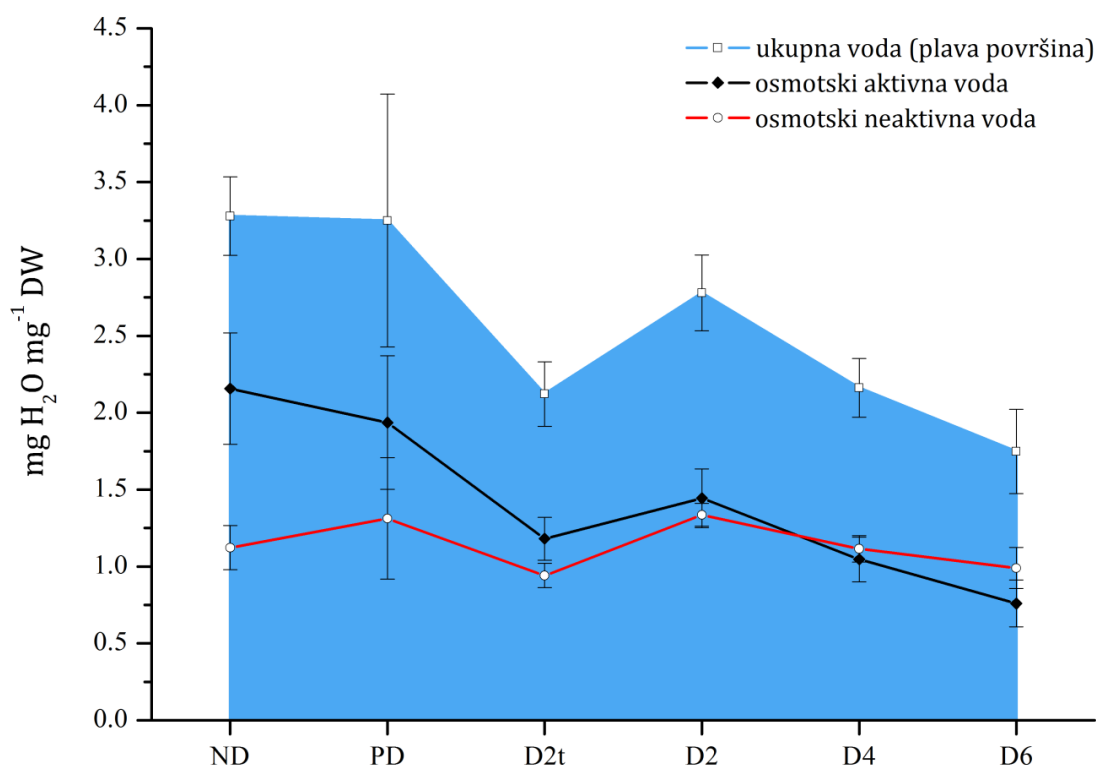
Statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ , Bonferonijev test) između eksperimentalnih grupa prikazane su u Tabeli 8, dok su srednje vrednosti i standardne greške prikazane u Tabeli 31 u Prilozima.

**Tabela 8.** Sadržaj ukupne (a), sadržaj osmotski aktivne (b) i sadržaj osmotski neaktivne vode (c) u srednjem crevu larvi *O. nubilalis* – jednofaktorska ANOVA i *post hoc* Bonferonijev test za nivo značajnosti od  $p < 0,05$  (1 – značajno, 0 – nije statistički značajno).

a) ukupna voda							b) osmotski aktivna							c) osmotski neaktivna						
	ND	PD	D2t	D2	D4	D6		ND	PD	D2t	D2	D4	D6		ND	PD	D2t	D2	D4	D6
ND		0	1	1	1	1	ND		0	1	1	1	1	ND		0	0	0	0	0
PD			1	1	0	1	PD			1	1	0	1	PD			0	1	0	0
D2t				0	0	0	D2t				0	0	0	D2t				0	0	0
D2					0	0	D2					0	0	D2					1	0
D4						0	D4						0	D4						0
D6							D6							D6						

#### 4.2.1.3 Svilene žlezde

Rezultati pokazuju da se količine ukupne i OA vode u svilenim žlezdama ne menjaju statistički značajno tokom dijapauze, iako se može uočiti trend pada ukupne vode (Grafik 4). Jedino se količina OA vode značajno smanjuje na kraju dijapauze, u odnosu na nedijapauzirajuću i predijapauzirajuću grupu.



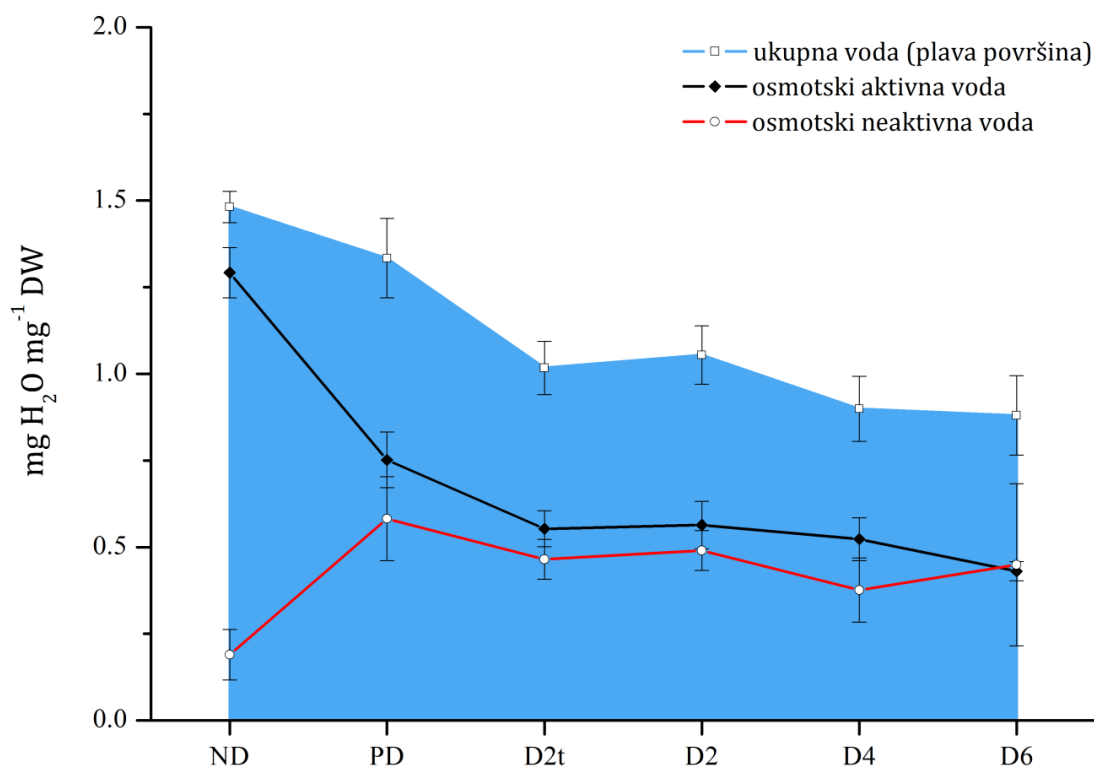
**Grafik 4.** Sadržaj ukupne, osmotski aktivne i osmotski neaktivne vode u svilenim žlezdama larvi *O. nubilalis*. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost sadržaja vode  $\pm$  standardna greška dobijena za 5 uzoraka po svakoj eksperimentalnoj grupi (DW – suva masa).

Rezultati jednofaktorske ANOVA analize i *post hoc* Bonferonijevog testa za nivo značajnosti  $p < 0,05$  nisu pokazali statistički značajnu razliku između grupa, sem D6 grupe, i zato nisu prikazani tabelarno. Srednje vrednosti i standardne greške su prikazane u Tabeli 31 u Prilozima.



#### 4.2.1.4 Epidermis sa kutikulom

Sadržaj ukupne, osmotski aktivne i neaktivne vode u epidermisu sa kutikulom značajno se razlikuje među eksperimentalnim grupama (Grafik 5).



**Grafik 5.** Sadržaj ukupne, osmotski aktivne i osmotski neaktivne vode u epidermisu sa kutikulom iz larvi *O. nubilalis*. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost sadržaja vode  $\pm$  standardna greška dobijena za 5 uzoraka po svakoj eksperimentalnoj grupi (DW – suva masa).

Sadržaj ukupne i osmotski aktivne vode u epidermisu sa kutikulom je najveći kod nedijapauzirajućih larvi i značajno opada u dijapauzi. Sa druge strane, sadržaj osmotski neaktivne vode je najmanji kod nedijapauzirajućih larvi, a povećan je kod predijapauzirajućih i dijapauzirajućih grupa. Tokom dijapauze sadržaj vode blago opada (Grafik 5).

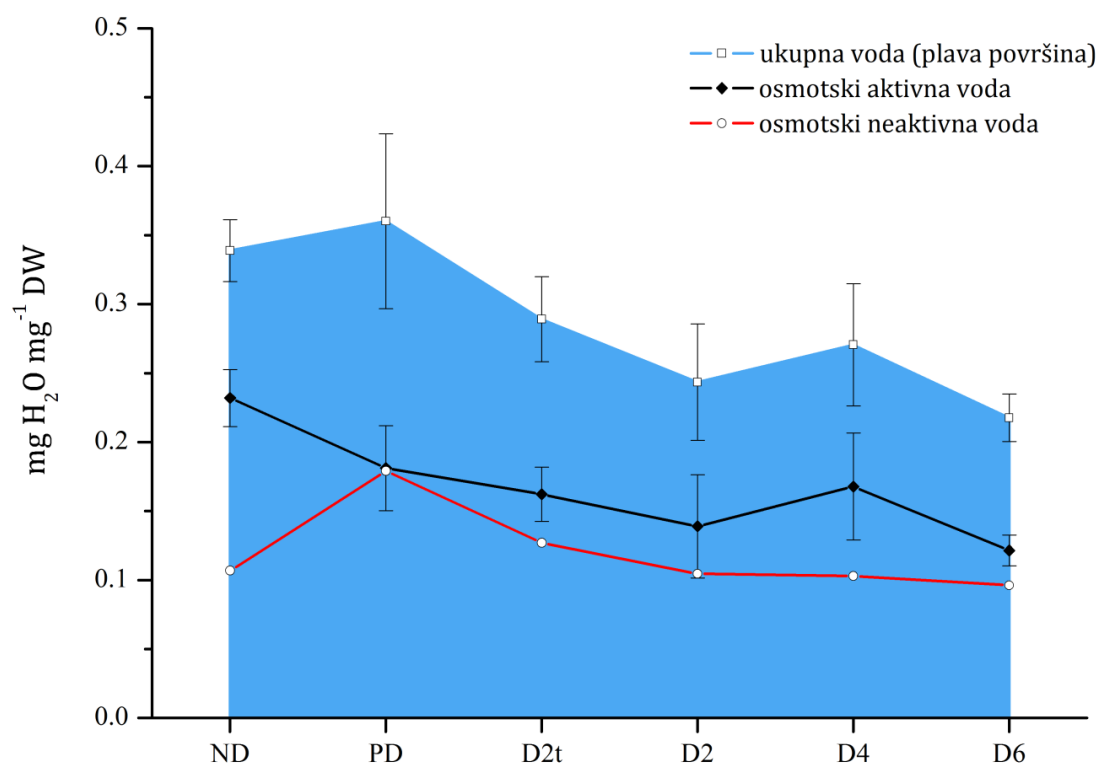
Statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ , Bonferonijev test) između eksperimentalnih grupa prikazane su u Tabeli 9, dok su srednje vrednosti i standardne greške prikazane u Tabeli 31 u Prilozima.

**Tabela 9.** Sadržaj ukupne (a), sadržaj osmotski aktivne (b) i sadržaj osmotski neaktivne vode (c) u epidermisu sa kutikulom iz larvi *O. nubilalis* – jednofaktorska ANOVA i *post hoc* Bonferonijev test za nivo značajnosti od  $p < 0,05$  (1 – značajno, 0 – nije statistički značajno).

	a) ukupna voda						b) osmotski aktivna						c) osmotski neaktivna					
	ND	PD	D2t	D2	D4	D6	ND	PD	D2t	D2	D4	D6	ND	PD	D2t	D2	D4	D6
ND		0	1	1	1	1	ND		1	1	1	1	ND		1	1	0	1
PD			0	0	1	1	PD			0	0	1	PD			0	0	0
D2t				0	0	0	D2t				0	0	D2t			0	0	0
D2					0	0	D2				0	0	D2				0	0
D4						0	D4					0	D4					0
D6							D6						D6					

#### 4.2.1.5 Masno telo

Sadržaj ukupne, osmotski aktivne i neaktivne vode najniži je u masnom telu, u odnosu na ostala ispitivana tkiva, i ne menja se značajno ulaskom gusenica u dijapauzu niti tokom trajanja dijapauze (Grafik 6).

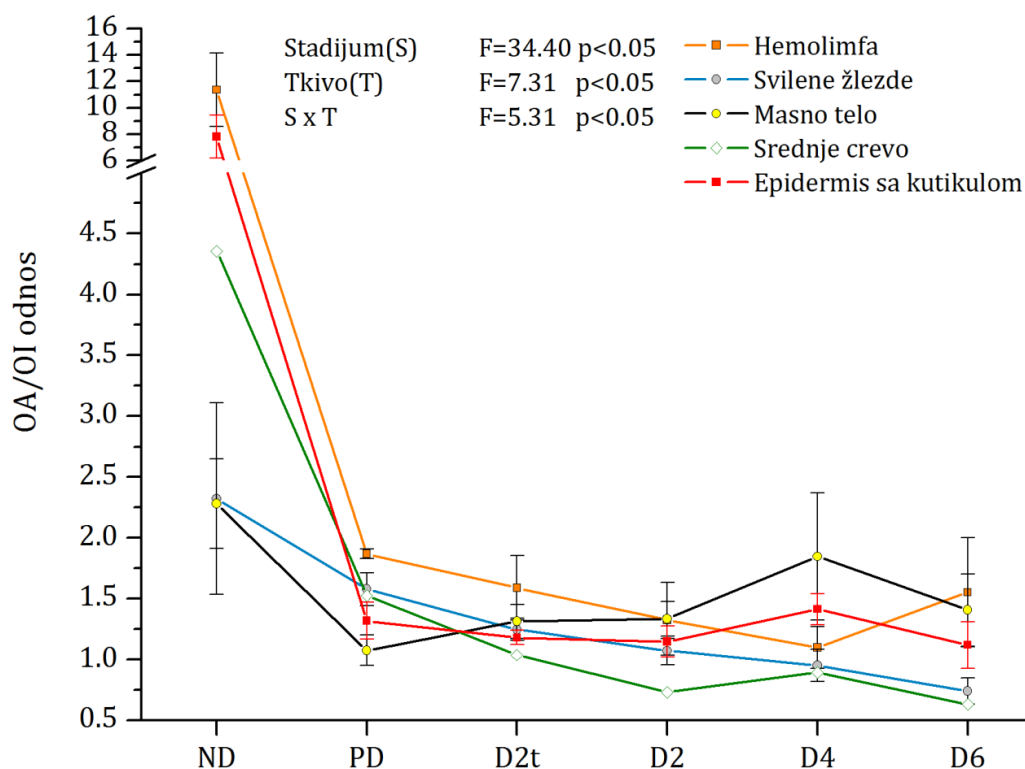


**Grafik 6.** Sadržaj ukupne, osmotski aktivne i osmotski neaktivne vode u masnom telu larvi *O. nubilalis*. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost sadržaja vode  $\pm$  standardna greška dobijena za 5 uzoraka po svakoj eksperimentalnoj grupi (DW – suva masa).

Rezultati jednofaktorske ANOVA analize i *post hoc* Bonferonijevog testa za nivo značajnosti  $p < 0,05$  nisu pokazali statistički značajnu razliku između grupa i zato nisu prikazani tabelarno. Srednje vrednosti i standardne greške su prikazane u Tabeli 31 u Prilozima.

#### 4.2.2 Odnos osmotski aktivne i neaktivne vode

Odnos OA i OI vode je veći u svim tkivima nedijapauzirajućih larvi u odnosu na predijapauzirajuće i dijapauzirajuće larve (Grafik 7). Odnos OA/OI je najviši u ND grupi i varira od 2 do 15, u zavisnosti od analiziranog tkiva. U hemolimfi je OA/OI oko 11, u epidermisu sa kutikulom oko 8 i srednjem crevu 4, a najniži je u masnom telu i svilenim žlezdama (1-2). U toku dijapauze odnos OA/OI opada na vrednosti između 1-1,5. Odnos OA/OI je najniži (oko 1) u hemolimfi gusenica iz D4 grupe, srednjem crevu i svilenim žlezdama gusenica iz D6 grupe.



**Grafik 7.** Odnos osmotski aktivne i neaktivne vode u tkivima larvi *O. nubilalis*. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost količnika OA i OI ± standardna greška dobijena za 5 uzoraka po svakoj eksperimentalnoj grupi. Statistička značajnost analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) i *post hoc* Bonferonijevim testom ( $p < 0,05$ ) za faktore (F) stadijuma i tkiva, kao i njihove interakcije.

Odnos OA/OI se ne menja statistički značajno u masnom telu ni u svilenim žlezdama, sem na kraju dijapauze kada je manji u odnosu na ND grupu.

Rezultati dvofaktorske analize, efekata stadijuma i tkiva, i *post hoc* Bonferonijevog testa su pokazali da postoji statistički značajna razlika odnosa OA/OI vode između ND i ostalih grupa (Tabela 10), dok nisu utvrđene značajne razlike odnosa OA/OI vode između predijapauzirajućih i dijapauzirajućih grupa.

**Tabela 10.** Dvofaktorska analiza varijanse (ANOVA) odnosa OA i OI vode u različitim stadijumima (faktor S) i tkivima (faktor T) larvi *O. nubilalis* (\*nivo značajnosti  $p < 0,05$ ).

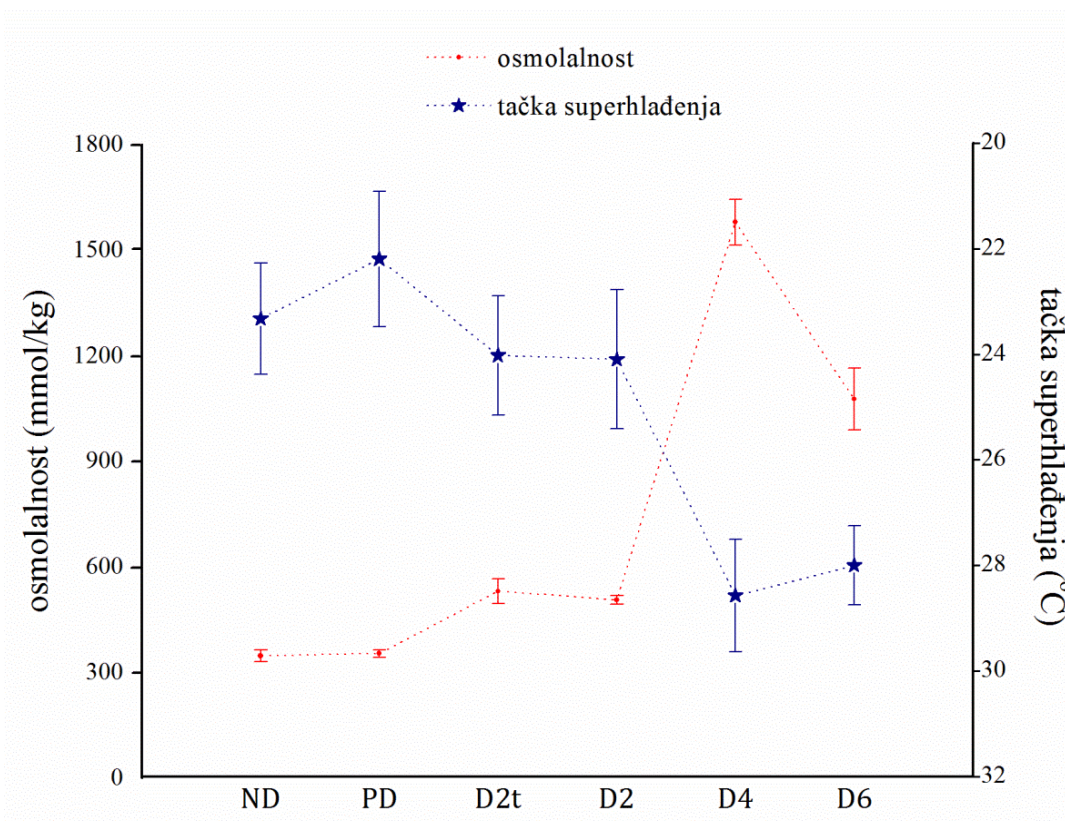
OA/OI	stepen slobode	suma kvadrata	srednja vrednost kvadrata	F	p
Stadijum (S)	5	403,55	80,71	34,40*	0
Tkivo (T)	4	68,574	17,14	7,31*	$2,66 \times 10^{-5}$
Interakcija (SxT)	20	248,93	12,45	5,31*	$2,32 \times 10^{-9}$
Greška	120	281,54	2,35	--	

Značajne razlike u OA/OI odnosu utvrđene su između hemolimfe i drugih analiziranih tkiva, sem epidermisa. Takođe, dvofaktorska ANOVA je pokazala da postoji statistički značajna interakcija između faktora stadijuma i tkiva, kada je u pitanju promena OA/OI odnosa (Tabela 10). Srednje vrednosti i standardne greške odnosa OA/OI vode u svim eksperimentalnim grupama prikazane su u Tabeli 31 u Prilozima.

## 4.2.3 Osmolalnost i tačka superhlađenja

### 4.2.3.1 Hemolimfa

Osmolalnost i tačka superhlađenja hemolimfe razlikuju se među eksperimentalnim grupama i imaju suprotne trendove. Osmolalnost hemolimfe raste u dijapauzi, a tačka superhlađenja opada (Grafik 8).



**Grafik 8.** Uporedni prikaz osmolalnosti hemolimfe i tačke superhlađenja tokom dijapauze larvi *O. nubilalis*. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška dobijena za 5 uzoraka po svakoj eksperimentalnoj grupi za tačku superhlađenja i 10 uzoraka za osmolalnost hemolimfe.

Najniža osmolalnost hemolimfe je izmerena kod nedijapauzirajućih i predijapauzirajućih gusenica (oko 350 mmol/kg), a najviša (oko 1600 mmol/kg) kod gusenica koje su četiri meseca u dijapauzi (D4).

Tačka superhlađenja ima obrnut trend, najniža je sredinom i krajem dijapauze, a najviša u nedijapauzirajućim i predijapauzirajućim larvama (Grafik 8).

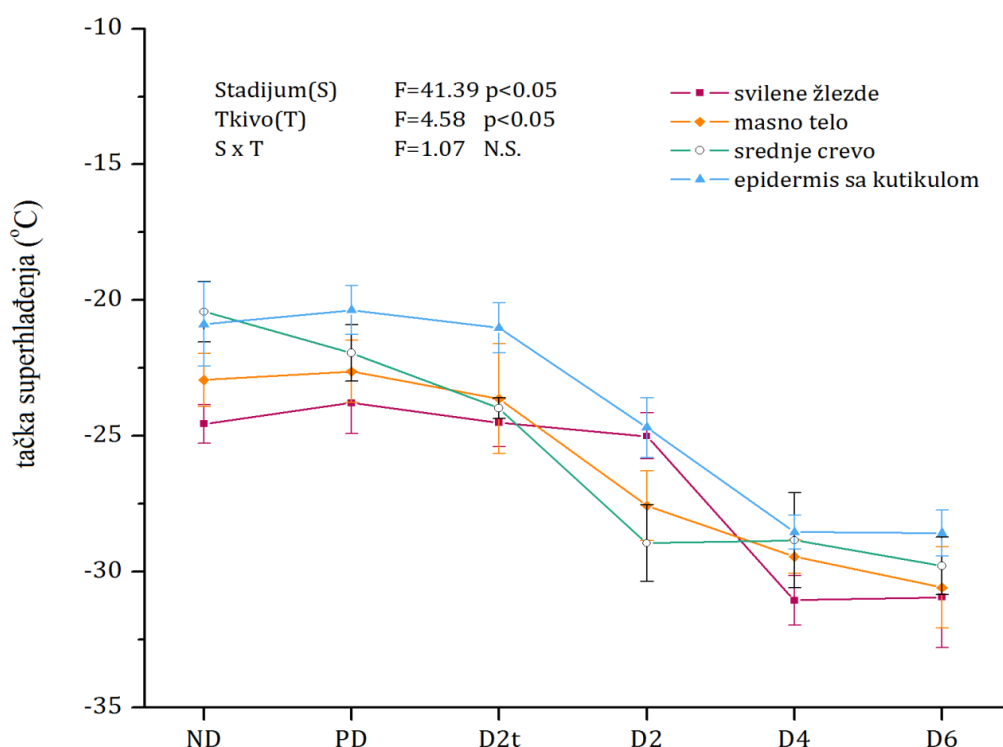
Statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ , Bonferonijev test) između eksperimentalnih grupa prikazane su u Tabeli 11, dok su srednje vrednosti i standardne greške prikazane u Tabeli 31 u Prilozima.

**Tabela 11.** Osmolalnost (a) i tačka superhlađenja (b) hemolimfe larvi *O. nubilalis* – jednofaktorska ANOVA i *post hoc* Bonferonijev test za nivo značajnosti od  $p < 0,05$  (1 – značajno, 0 – nije statistički značajno).

a)		osmolalnost					b)		tačka superhlađenja				
	ND	PD	D2t	D2	D4	D6		ND	PD	D2t	D2	D4	D6
ND		0	0	0	1	1	ND		0	0	0	1	1
PD			0	0	1	1	PD			0	0	1	1
D2t				0	1	1	D2t				0	1	1
D2					1	1	D2					1	1
D4						1	D4						1
D6							D6						

#### 4.2.3.2 Svilene žlezde, masno telo, srednje crevo i epidermis sa kutikulom

Tačka superhlađenja svilenih žlezda, masnog tela, srednjeg creva i epidermisa sa kutikulom se razlikuje između eksperimentalnih grupa (Grafik 9). Tačka superhlađenja različitih tkiva je niža kod larvi koje su u dijapauzi na 5°C (D2, D4, D6) u odnosu na larve koje su gajene na 22°C (ND, PD i D2t).



**Grafik 9.** Uporedni prikaz tačke superhlađenja različitih tkiva tokom dijapauze larvi *O. nubilalis*. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška dobijena za 5 uzoraka po svakoj eksperimentalnoj grupi. Statistička značajnost analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) i *post hoc* Bonferonijevim testom ( $p < 0,05$ ) za faktore (F) stadijuma i tkiva, kao i njihove interakcije.

Rezultati dvofaktorske analize, efekata stadijuma i tkiva, i *post hoc* Bonferonijevog testa su pokazali da između gusenica koje su bile aklimatizovane na više temperature (D2t, ND, PD) ne postoji statistički značajna promena u tački superhlađenja.



Sa druge strane, tačke superhlađenja značajno opadaju tokom dijavauze, dostižući najveću depresiju sredinom i krajem mirovanja (D4 i D6 grupe), mada se početak snižavanja tačke superhlađenja diskretno razlikuje među analiziranim tkivima (Grafik 9).

Rezultati dvofaktorske analize, efekata stadijuma i tkiva, i *post hoc* Bonferonijevog testa su pokazali da statistički značajna razlika postoji između tačke superhlađenja epidermisa i tačaka superhlađenja masnog tela i svilenih žlezda.

Dvofaktorska ANOVA pokazala je da ne postoji statistički značajna interakcija između dva faktora, stadijuma i tkiva, kada je u pitanju tačka superhlađenja (Tabela 12).

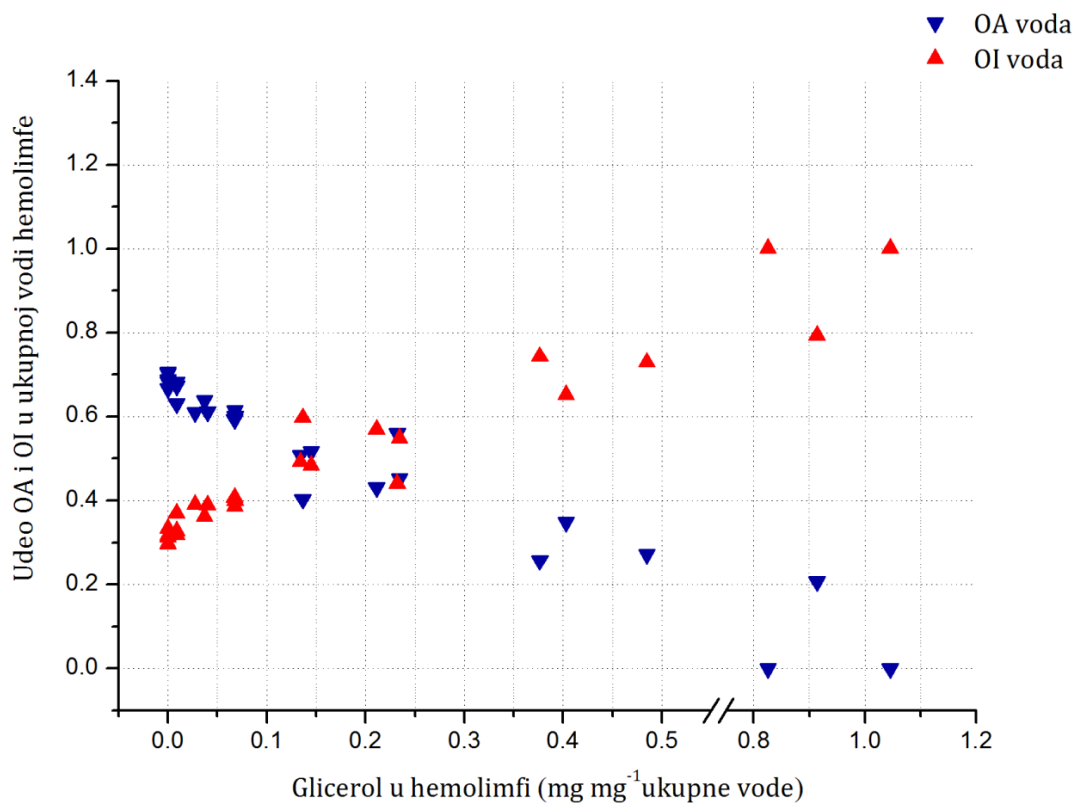
**Tabela 12.** Dvofaktorska analiza varijanse (ANOVA) odnosa tačke superhlađenja (SCP) različitih tkiva (faktor T) i različitih stadijuma (faktor S) larvi *O. nubilalis* (\*nivo značajnosti  $p < 0,05$ ; N.S. – nije značajno).

SCP	stepen slobode	suma kvadrata	srednja vrednost kvadrata	F	p
Stadijum (S)	5	1 400,07	280,01	41,39*	0
Tkivo (T)	4	123,90	30,98	4,58*	$1,78 \times 10^{-3}$
Interakcija (SxT)	20	145,40	7,27	1,07 <sup>N.S.</sup>	0,38
Greška	120	811,74	6,76		--

Srednje vrednosti i standardne greške tačke superhlađenja, za sve eksperimentalne grupe, prikazane su u Tabeli 31 u Prilozima.

#### 4.2.4 Uticaj glicerola na sadržaj OA i OI vode u hemolimfi u *in vitro* uslovima

Metodom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije praćen je efekat dodatka glicerola u hemolimfu nedijapauzirajućih larvi (Grafik 10).



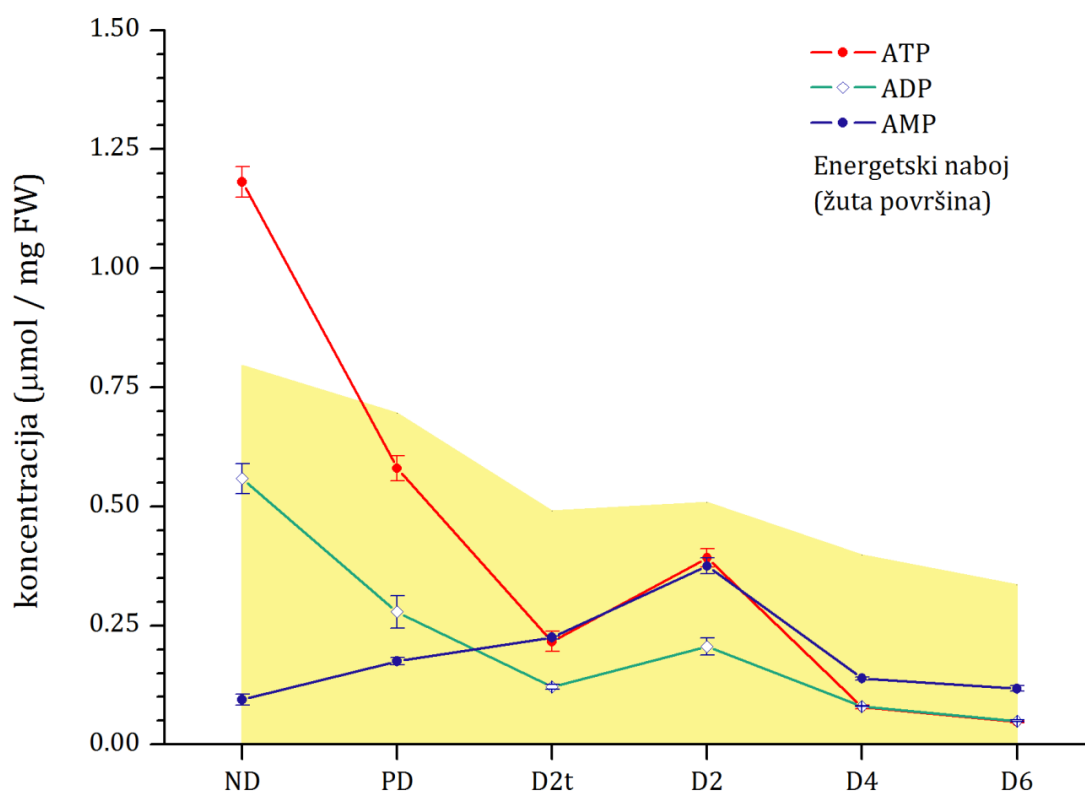
**Grafik 10.** Zavisnost količine OA i OI vode u hemolimfi od količine dodatog glicerola. Objašnjenje je dato u tekstu.

Rezultati su pokazali da se sa porastom količine dodatog glicerola sadržaj OA vode smanjuje, a sadržaj OI vode povećava u hemolimfi nedijapauzirajućih larvi.

### 4.3 Sadržaj pojedinih nukleotida i koenzima

#### 4.3.1 ATP, ADP, AMP i energetski naboj

Kapilarnom elektroforezom merena je koncentracija adenin nukleotida, nakog čega je izračunat energetski naboj i odnos adenozin-fosfata (Grafik 11). Rezultati su pokazali da su koncentracije ATP-a i ADP-a najveće u nedijapauzirajućim, a manje u predijapauzirajućim i dijapauzirajućim gusenicama. Kod gusenica koje su bile u dijapauzi na 5°C koncentracija adenin nukleotida najveća je na početku dijapauze (D2), nakon čega postepeno opada.



**Grafik 11.** Sadržaj adenin nukleotida i energetski naboj (žuta površina) u larvama *O. nubilalis*. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost koncentracije  $\pm$  standardna greška dobijena za 3 nezavisna pula (5 gusenica čini jedan pul).

Energetski naboj kod nedijapauzirajućih larvi je najviši ( $\sim 0,8$ ), opada kod dijapauzirajućih grupa i dostiže najniži nivo na kraju dijapauze ( $\sim 0,4$ ). Koncentracija AMP-a je najmanja u nedijapauzirajućim gusenicama, a najveća u dijapauzirajućoj grupi 2 meseca na  $5^{\circ}\text{C}$ , nakon čega opada i održava se na određenom nivou. U larvama koje su ušle u dijapauzu, ali su bile na višoj temperaturi (D2t), takođe opada količina ATP i ADP nukleotida i to na nivoe niže od onih u D2 grupi.

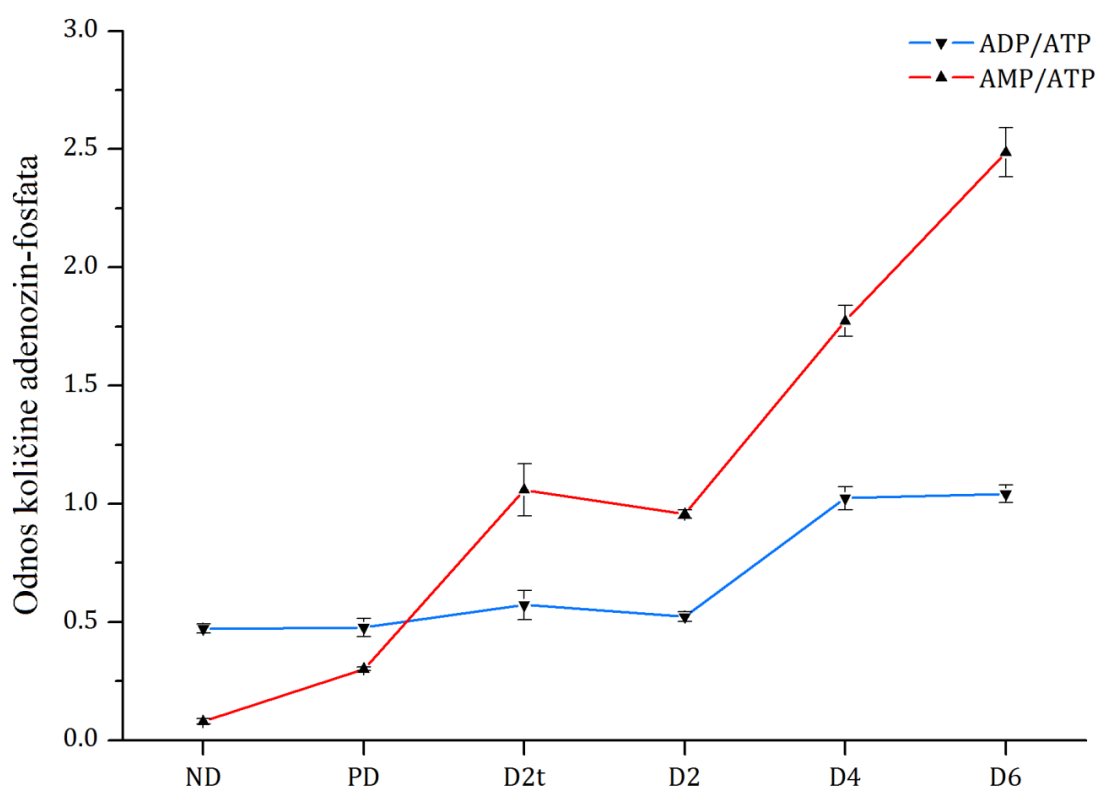
Statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ , Bonferonijev test) između eksperimentalnih grupa prikazane su u Tabeli 13, dok su srednje vrednosti i standardne greške prikazane u Tabeli 32 u Prilozima.

**Tabela 13.** Sadržaj adenin nukleotida (a, b, c) i energetski naboj (d) – jednofaktorska ANOVA i *post hoc* Bonferonijev test za nivo značajnosti od  $p < 0,05$  (1 – značajno, 0 – nije statistički značajno).

a) ATP							b) ADP						
	ND	PD	D2t	D2	D4	D6		ND	PD	D2t	D2	D4	D6
ND		1	1	1	1	1	ND		1	1	1	1	1
PD			1	1	1	1	PD			1	0	1	1
D2t				1	1	1	D2t				0	0	0
D2					1	1	D2					1	1
D4						0	D4						0
D6							D6						
c) AMP							d) Energetski naboj						
	ND	PD	D2t	D2	D4	D6		ND	PD	D2t	D2	D4	D6
ND		1	1	1	0	0	ND		1	1	1	1	1
PD			1	1	0	1	PD			1	1	1	1
D2t				1	1	1	D2t				0	1	1
D2					1	1	D2					1	1
D4						0	D4						1
D6							D6						

### 4.3.2 Odnos koncentracije adenozin-fosfata

Poređenjem odnosa koncentracija različitih adenin nukleotida utvrđeno je da su ADP/ATP i AMP/ATP odnosi veći u dijapauzirajućim grupama, u poređenju sa nedijapauzirajućim (Grafik 12).



**Grafik 12.** Odnos količine adenozin-fosfata u larvama *O. nubilalis*. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška dobijena za 3 nezavisna pula (5 gusenica čini jedan pul).

Takođe, sa grafika se može uočiti da i ADP/ATP i AMP/ATP odnosi značajno rastu tokom dijapauze, s tim što je porast odnosa AMP/ATP izraženiji od porasta odnosa ADP/ATP i počinje već u predijapauzirajućim larvama (PD).

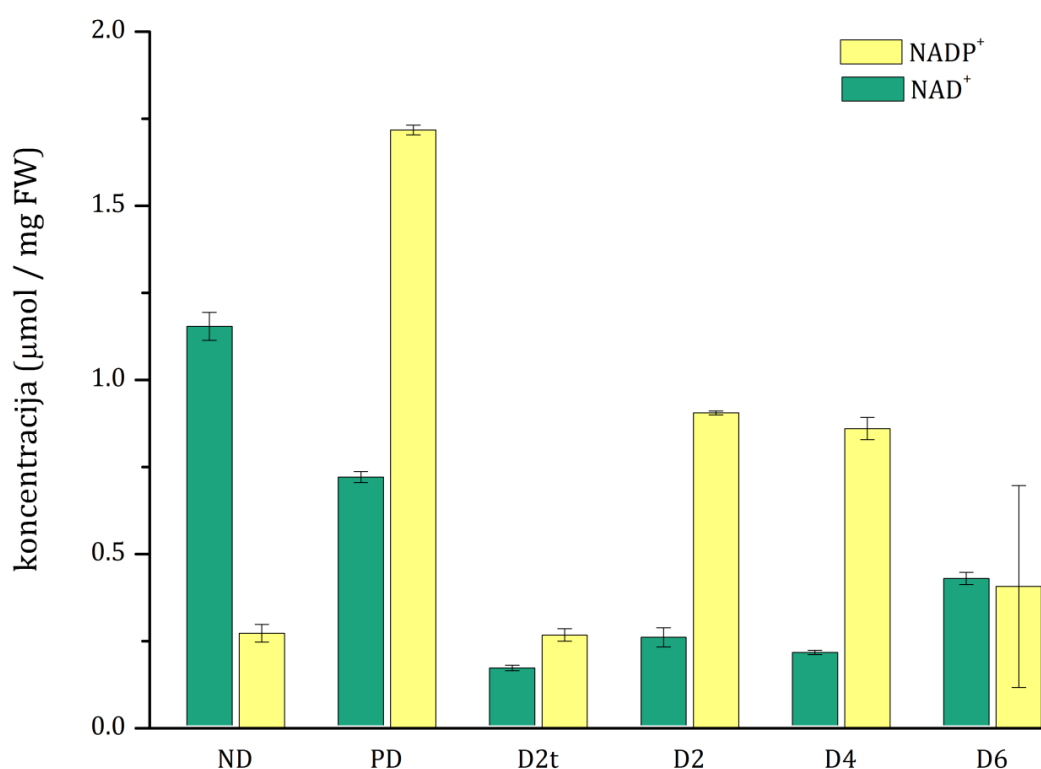
Statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ , Bonferonijev test) između eksperimentalnih grupa prikazane su u Tabeli 14, dok su srednje vrednosti i standardne greške prikazane u Tabeli 32 u Prilozima.

**Tabela 14.** Odnos ADP/ATP (a) i AMP/ATP (b) adenin nukleotida u larvama *O. nubilalis* – jednofaktorska ANOVA i *post hoc* Bonferonijev test za nivo značajnosti od  $p < 0,05$  (1 – značajno, 0 – nije statistički značajno).

a) ADP/ATP							b) AMP/ATP						
	ND	PD	D2t	D2	D4	D6		ND	PD	D2t	D2	D4	D6
ND		0	0	0	1	1	ND		0	1	1	1	1
PD			0	0	1	1	PD			1	1	1	1
D2t				0	1	1	D2t				0	1	1
D2					1	1	D2					1	1
D4						0	D4						1
D6							D6						

### 4.3.3 NAD<sup>+</sup> i NADP<sup>+</sup>

Kapilarnom elektroforezom merena je koncentracija NAD<sup>+</sup> i NADP<sup>+</sup> koenzima. Utvrđeno je da se koncentracije NAD<sup>+</sup> i NADP<sup>+</sup> koenzima razlikuju kako međusobno, tako i između eksperimentalnih grupa (Grafik 13).



**Grafik 13.** Sadržaj NAD<sup>+</sup> i NADP<sup>+</sup> koenzima u larvama *O. nubilalis*. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost koncentracije ± standardna greška dobijena za 3 nezavisna pula (5 gusenica čini jedan pul).

Koncentracija NAD<sup>+</sup> koenzima je viša u nedijapauzirajućim i predijapauzirajućim larvama, a niža u larvama koje su u dijapauzi. Na kraju dijapauze (D6) količina NAD<sup>+</sup> se udvostručuje u odnosu na početak dijapauze (D2).

Sa druge strane, koncentracija NADP<sup>+</sup> koenzima je niska u nedijapauzirajućim, najviša u predijapauzirajućim i smanjuje se u dijapauzirajućim larvama. Utvrđeno je da je koncentracija NADP<sup>+</sup> viša u prvim mesecima dijapauze (D2, D4), a na kraju

dijapauze se smanjuje (D6). Koncentracija oba analizirana koenzima je niža u larvama koje su u dijapauzi na višoj temperaturi (D2t) u odnosu na larve koje dijapauziraju na nižoj (D2).

Statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ , Bonferonijev test) između eksperimentalnih grupa prikazane su u Tabeli 15, dok su srednje vrednosti i standardne greške prikazane u Tabeli 33 u Prilozima.

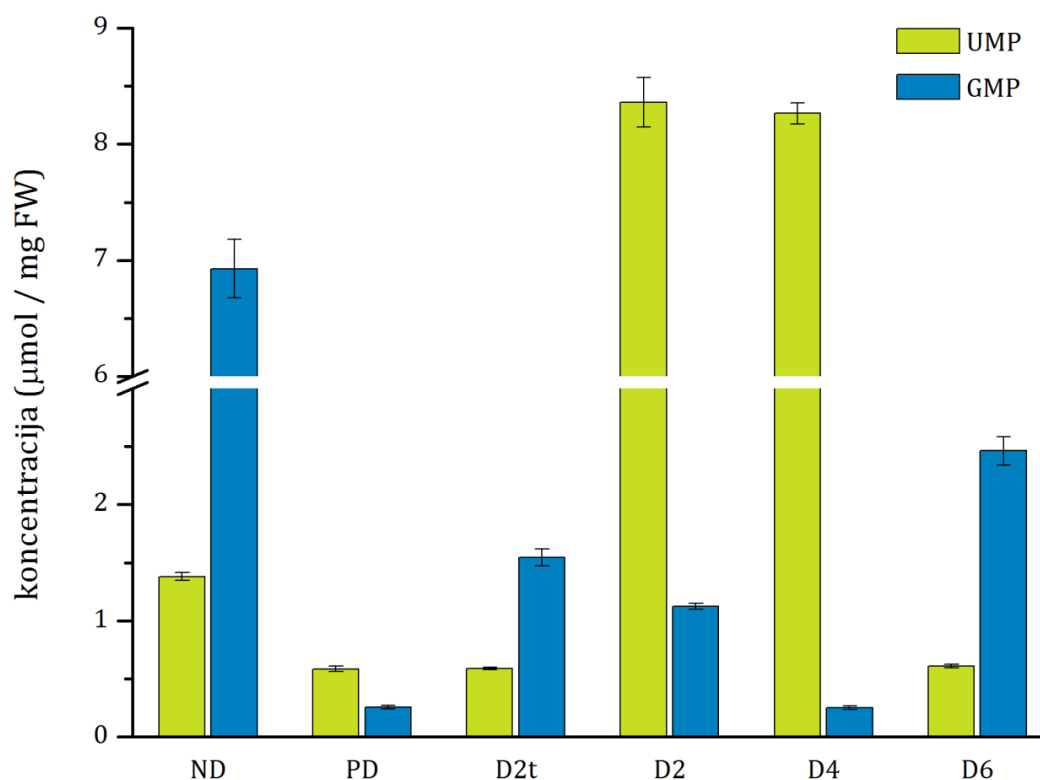
**Tabela 15.** Sadržaj  $\text{NAD}^+$ (a) i  $\text{NADP}^+$ (b) u larvama *O. nubilalis* – jednofaktorska ANOVA i *post hoc* Bonferonijev test za nivo značajnosti od  $p < 0,05$  (1 – značajno, 0 – nije statistički značajno).

a) $\text{NAD}^+$							b) $\text{NADP}^+$						
	ND	PD	D2t	D2	D4	D6		ND	PD	D2t	D2	D4	D6
ND		1	1	1	1	1	ND		1	0	1	1	0
PD			1	1	1	1	PD			1	1	1	1
D2t				0	0	1	D2t				1	1	0
D2					0	1	D2					0	0
D4						1	D4						0
D6							D6						



#### 4.3.4 UMP i GMP

Kapilarnom elektroforezom nukleotida merena je koncentracija UMP i GMP nukleotida. Utvrđeno je da se koncentracija oba nukleotida razlikuje kako međusobno, tako i između eksperimentalnih grupa (Grafik 14).



**Grafik 14.** Sadržaj UMP i GMP nukleotida u larvama *O. nubilalis*. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost koncentracije  $\pm$  standardna greška dobijena za 3 nezavisna pula (5 gusenica čini jedan pul).

Koncentracija UMP je relativno niska u svim grupama sem u dijapauzirajućim grupama D2 i D4, gde je koncentracija nekoliko puta povećana. Na kraju dijapauze koncentracija UMP značajno opada (D6). Suprotno tome, koncentracija GMP je najviša kod nedijapauzirajućih larvi, veoma niska kod predijapauzirajućih, dok se među dijapauzirajućim larvama razlikuje. Koncentracija ovog nukleotida je u

dijapauzirajućim larvama umereno visoka početkom (D2t, D2), opada sredinom (D4) i značajno raste na kraju (D6) dijapauze.

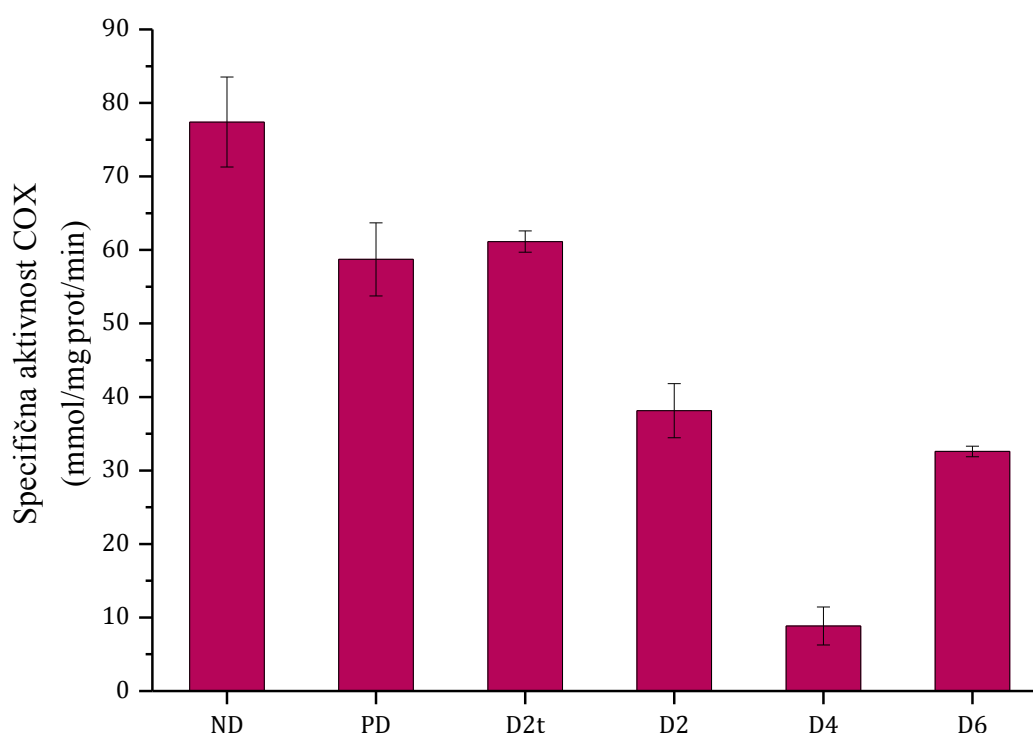
Statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ , Bonferonijev test) između eksperimentalnih grupa prikazane su u Tabeli 16, dok su srednje vrednosti i standardne greške prikazane u Tabeli 33 u Prilozima.

**Tabela 16.** Sadržaj UMP (a) i GMP (b) nukleotida u larvama *O. nubilalis* – jednofaktorska ANOVA i *post hoc* Bonferonijev test za nivo značajnosti od  $p < 0,05$  (1 – značajno, 0 – nije statistički značajno).

a) UMP							b) GMP						
	ND	PD	D2t	D2	D4	D6		ND	PD	D2t	D2	D4	D6
ND		1	1	1	1	1	ND		1	1	1	1	1
PD			0	1	1	0	PD			1	1	0	1
D2t				1	1	0	D2t				0	1	1
D2					0	1	D2					1	1
D4						1	D4						1
D6							D6						

#### 4.4 Aktivnost citohrom *c* oksidaze (COX)

Specifična aktivnost citohrom *c* oksidaze razlikuje se između eksperimentalnih grupa. Aktivnost je veća u grupama gajenim na 22°C (ND, PD, D2t) u odnosu na grupe aklimatizovane na 5°C (D2, D4, D6), a najviša je u nedijapauzirajućim larvama (Grafik 15).



**Grafik 15.** Specifična aktivnost citohrom *c* oksidaze u mitohondrijskoj frakciji celog tela larvi *O. nubilalis*. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost aktivnosti  $\pm$  standardna greška dobijena za 3 nezavisna pula (5 gusenica čini jedan pul).

U larvama koje su u dijapauzi na 5°C aktivnost ovog enzima opada sredinom dijapauze (D4), da bi se pred kraj ponovo povećala (Grafik 15). Aktivnost COX se značajno razlikuje među dijapauzirajućim larvama koje su dva meseca pod različitim temperaturnim režimima (D2t i D2) – u grupi koja je na višoj temperaturi (D2t) aktivnost enzima je veća.

Statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ , Bonferonijev test) između eksperimentalnih grupa prikazane su u Tabeli 17, dok su srednje vrednosti i standardne greške prikazane u Tabeli 34 u Prilozima.

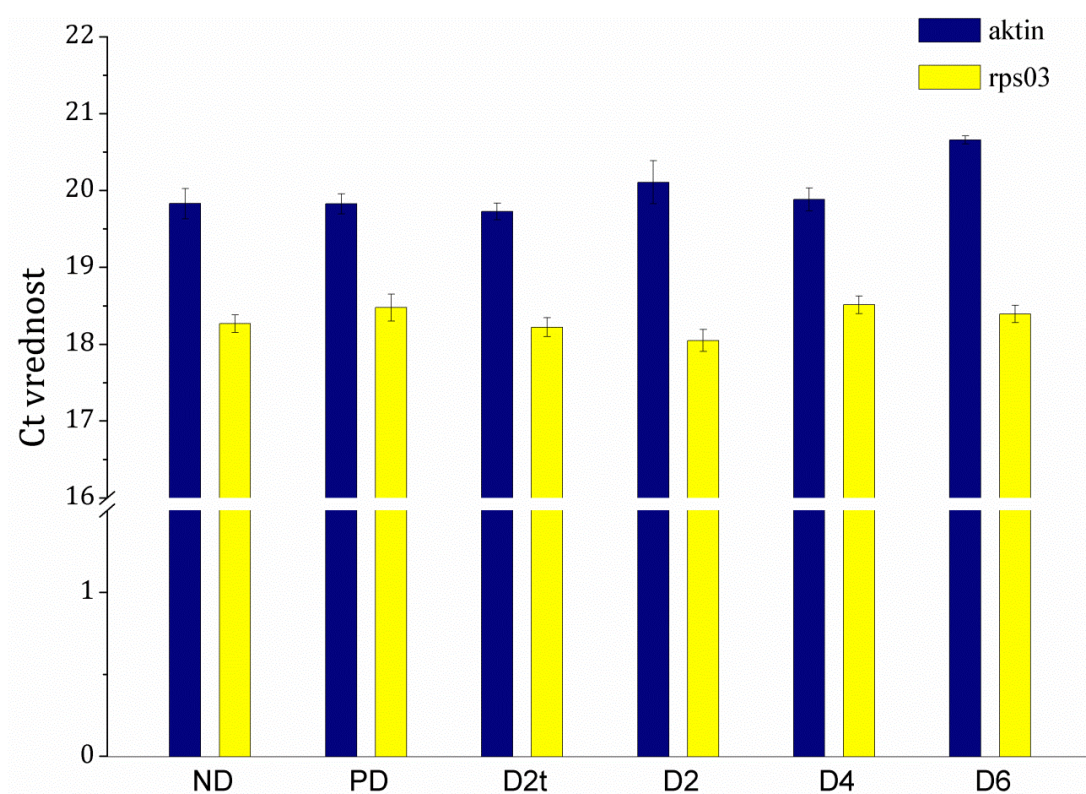
**Tabela 17.** Specifična aktivnost citohrom *c* oksidaze u mitohondrijskoj frakciji celih larvi *O. nubilalis* – jednofaktorska ANOVA i *post hoc* Bonferonijev test za nivo značajnosti od  $p < 0,05$  (1 – značajno, 0 – nije statistički značajno).

	ND	PD	D2t	D2	D4	D6
ND		0	0	1	1	1
PD			0	1	1	1
D2t				1	1	1
D2					1	0
D4						1
D6						

## 4.5 Relativna ekspresija odabranih gena

### 4.5.1 Ct vrednosti referentnih gena

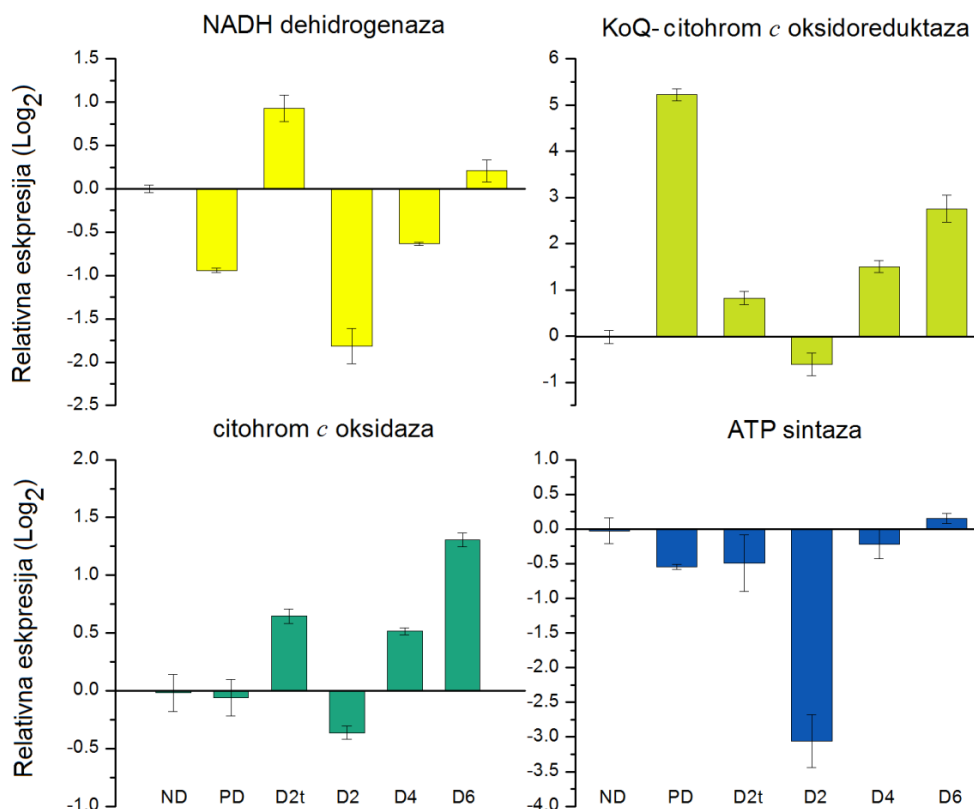
Ct vrednosti dobijene za oba referentna gena ne variraju statistički značajno (Grafik 16), a Ct vrednosti aktina su više u odnosu na Ct vrednosti *rps03*.



**Grafik 16.** Ct vrednosti referentnih gena – aktina i *rps03*. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost Ct  $\pm$  standardna greška dobijena za 6 reakcija za svaku eksperimentalnu grupu. Rezultati su analizirani jednofaktorskom ANOVA i *post hoc* Bonferonijevim testom za nivo značajnosti  $p < 0,05$ .

#### 4.5.2 Geni elektron-transportnog lanca i ATP sintaze

Relativna ekspresija gena pojedinih subjedinica elektron-transportnog lanca u masnom telu gusenica se razlikuje kako između eksperimentalnih grupa, tako i između samih analiziranih gena (Grafik 17).



**Grafik 17.** Relativna ekspresija gena pojedinih kompleksa elektron-transportnog lanca i ATP sintaze. Rezultati su prikazani u odnosu na kontrolu (ND=0) i izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška dobijena za 3 nezavisna pula (masno telo 5 gusenica činilo je jedan pul).

U odnosu na ND grupu, ekspresija KoQ-citohrom *c* oksidoreduktaze i citohrom *c* oksidaze se statistički značajno povećava u dijapauzirajućim grupama. Sa druge strane, ekspresija NADH dehidrogenaze i ATP sintaze je smanjena na početku dijapauze, a zatim postepeno raste, da bi na kraju dijapauze bila istog nivoa kao kod nedijapauzirajućih larvi. Ekspresija gena elektron-transportnog lanca kod predijapauzirajućih larvi je različita i specifična za svaki gen – za citohrom *c*

oksidazu i ATP sintazu se ne razlikuje značajno u odnosu na ND grupu, dok je ekspresija NADH dehidrogenaze i citohrom *c* oksidoreduktaze povećana u odnosu na ND, naročito kod oksidoreduktaze (Grafik 17). Kod dijapauzirajućih larvi relativna ekspresija svih analiziranih gena elektron-transportnog lanca ima karakterističan obrazac – viša je kod D2t grupe u odnosu na D2 grupu, a tokom dijapauze na niskoj temperaturi (D2, D4, D6) ima trend postepenog povećanja i najveća je na kraju dijapauze (D6).

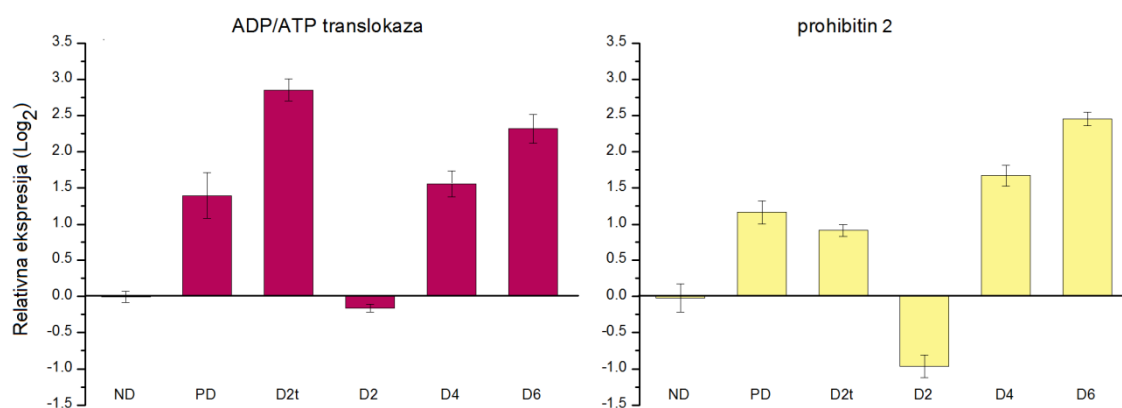
Statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ , Bonferonijev test) između eksperimentalnih grupa prikazane su u Tabeli 18, dok su srednje vrednosti i standardne greške prikazane u Tabeli 35 u Prilozima.

**Tabela 18.** Relativna ekspresija gena elektron-transportnog lanca (a, b, c) i ATP sintaze (d) u masnom telu larvi *O. nubilalis* – jednofaktorska ANOVA i *post hoc* Bonferonijev test za nivo značajnosti od  $p < 0,05$  (1 – značajno, 0 – nije statistički značajno).

a) NADH dehidrogenaza							b) KoQ-citohrom <i>c</i> oksidoreduktaza						
	ND	PD	D2t	D2	D4	D6		ND	PD	D2t	D2	D4	D6
ND		1	1	1	1	0	ND		1	0	0	1	1
PD			1	1	0	1	PD			1	1	1	1
D2t				1	1	1	D2t				1	0	1
D2					1	1	D2					1	1
D4						1	D4						1
D6							D6						
c) citohrom <i>c</i> oksidaza							d) ATP sintaza						
	ND	PD	D2t	D2	D4	D6		ND	PD	D2t	D2	D4	D6
ND		0	1	0	1	1	ND		0	0	1	0	0
PD			1	0	1	1	PD			0	1	0	0
D2t				1	0	1	D2t				1	0	0
D2					1	1	D2					1	1
D4						1	D4						0
D6							D6						

### 4.5.3 Geni za ADP/ATP translokazu i prohibitin 2

Relativna ekspresija gena za ADP/ATP translokazu (*ANT*) i prohibitin 2 (*Phb2*) ima sličan obrazac i značajno se razlikuje između eksperimentalnih grupa (Grafik 18).



**Grafik 18.** Relativna ekspresija gena za ADP/ATP translokazu i prohibitin 2. Rezultati su prikazani u odnosu na kontrolu (ND=0) i izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška dobijena za 3 nezavisna pula (masno telo 5 gusenica činilo je jedan pul).

U odnosu na nedijapauzirajuće larve relativna ekspresija oba gena je povećana kod svih eksperimentalnih grupa, sem na početku dijapauze na niskoj temperaturi (D2). U D2 grupi ekspresija je nepromenjena (ADP/ATP translokaza) ili smanjena (prohibitin) u odnosu na ND.

Kod dijapauzirajućih larvi relativna ekspresija oba gena ima karakterističan obrazac – najniža je kod D2 grupe i postepeno se povećava dostižući maksimum krajem dijapauze (D6). Takođe, na Grafiku 18 može se uočiti da je ekspresija oba gena značajno veća kod dijapauzirajuće grupe na višoj temperaturi (D2t), u poređenju sa gusenicama iste starosti na nižoj temperaturi (D2).



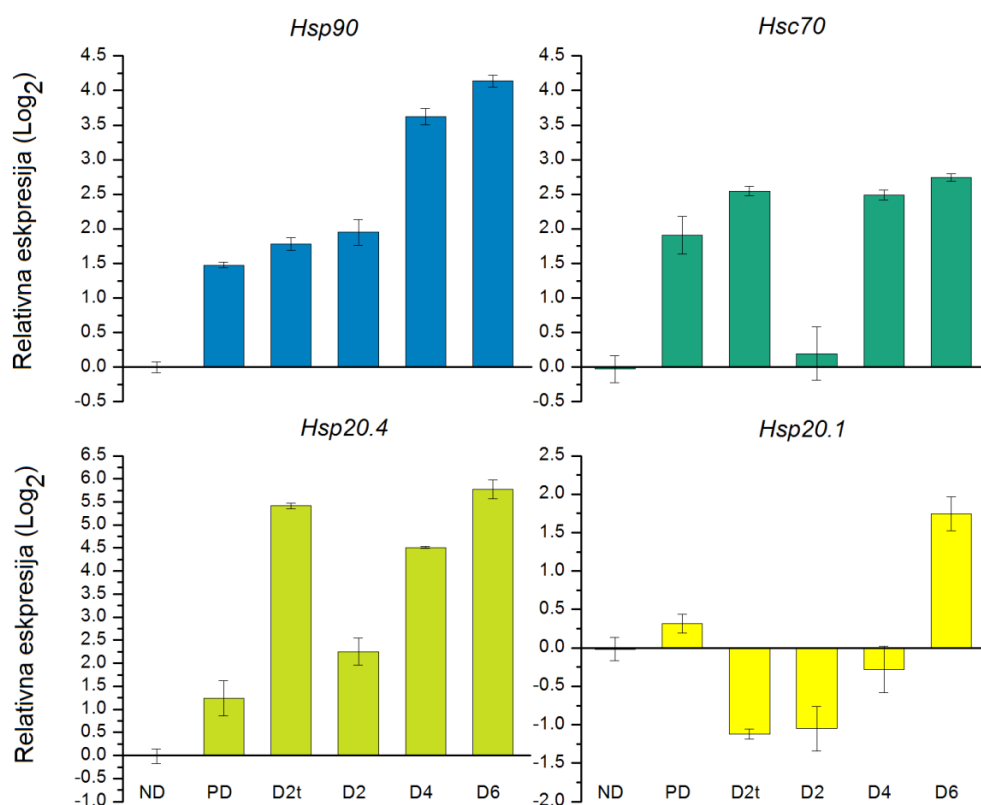
Statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ , Bonferonijev test) između eksperimentalnih grupa prikazane su u Tabeli 19, dok su srednje vrednosti i standardne greške prikazane u Tabeli 35 u Prilozima.

**Tabela 19.** Relativna ekspresija gena za ADP/ATP translokazu (a) i prohibitin 2 (b) u masnom telu larvi *O. nubilalis* – jednofaktorska ANOVA i *post hoc* Bonferonijev test. Nivo značajnosti  $p < 0,05$  (1 – značajno, 0 – nije statistički značajno).

a) ADP/ATP translokaza							b) prohibitin 2						
	ND	PD	D2t	D2	D4	D6		ND	PD	D2t	D2	D4	D6
ND		1	1	0	1	1	ND		1	1	1	1	1
PD			1	1	0	0	PD			0	1	0	1
D2t				1	1	0	D2t				1	1	1
D2					1	1	D2					1	1
D4						0	D4						1
D6							D6						

#### 4.5.4 Geni proteina toplotnog stresa

Relativna ekspresija gena za odabrane proteine toplotnog stresa razlikuje se kako između eksperimentalnih grupa, tako i između analiziranih *Hsp* gena (Grafik 19).



**Grafik 19.** Relativna ekspresija gena proteina toplotnog stresa (*Hsp*). Rezultati su prikazani u odnosu na kontrolu (ND=0) i izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška dobijena za 3 nezavisna pula (masno telo 5 gusenica činilo je jedan pul).

*Hsp90*, *Hsc70* i *Hsp20.4* imaju slične obrasce ekspresije – u odnosu na ND grupu relativna ekspresija gena je povećana u svim eksperimentalnim grupama, sem u grupi D2 (*Hsc70*). Za razliku od njih, ekspresija *Hsp20.1* se u odnosu na ND ne razlikuje, sem u D2t grupi, kod koje je smanjena, i D6 grupi, kod koje je povećana.

U dijapauzirajućim grupama na nižoj temperaturi (D2, D4, D6) ekspresija svih gena je karakteristična – najniža je početkom dijapauze (D2) i postepeno raste dostižući maksimum na kraju (D6). Takođe, na Grafiku 19 može se uočiti da je ekspresija *Hsc70* i *Hsp20.4* gena značajno veća kod dijapauzirajuće grupe na višoj temperaturi (D2t), u poređenju sa gusenicama iste starosti, ali aklimatizovanim na nižoj temperaturi (D2). Za razliku od *Hsc70* i *Hsp20.4*, ekspresija *Hsp90* i *Hsp20.1* se ne razlikuje među D2t i D2 grupama.

Statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ , Bonferonijev test) između eksperimentalnih grupa prikazane su u Tabeli 20, dok su srednje vrednosti i standardne greške prikazane u Tabeli 35 u Prilozima.

**Tabela 20.** Relativna ekspresija *Hsp90* (a), *Hsc70* (b), *Hsp20.4* (c) i *Hsp20.1* (d) u masnom telu larvi *O. nubilalis* – jednofaktorska ANOVA i *post hoc* Bonferonijev test za nivo značajnosti od  $p < 0,05$  (1 – značajno, 0 – nije statistički značajno).

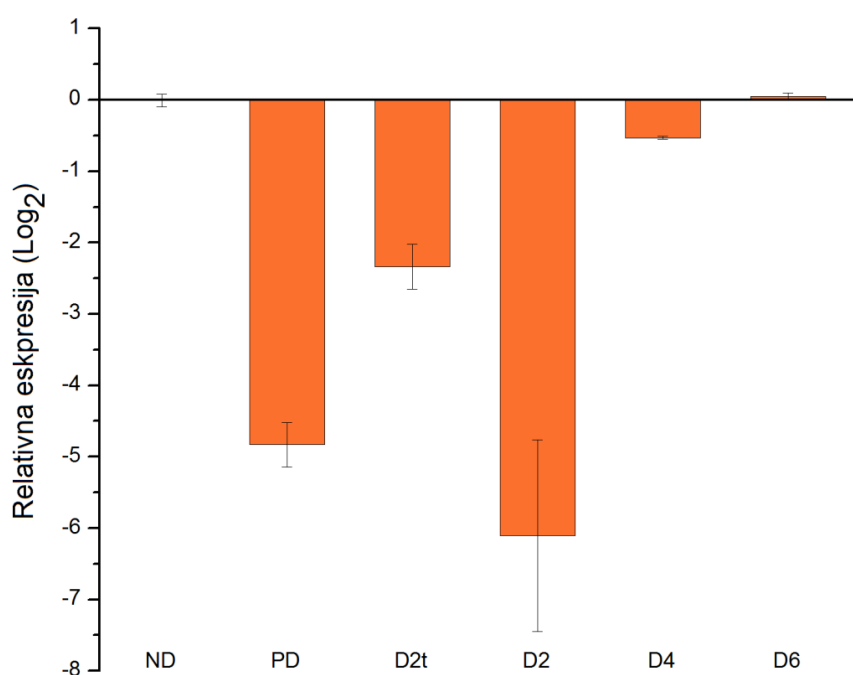
a) <i>Hsp90</i>							b) <i>Hsc70</i>						
	ND	PD	D2t	D2	D4	D6		ND	PD	D2t	D2	D4	D6
ND		1	1	1	1	1	ND		1	1	0	1	1
PD			0	0	1	1	PD			0	1	0	0
D2t				0	1	1	D2t				1	0	0
D2					1	1	D2					1	1
D4						0	D4						0
D6							D6						

c) <i>Hsp20.4</i>							d) <i>Hsp20.1</i>						
	ND	PD	D2t	D2	D4	D6		ND	PD	D2t	D2	D4	D6
ND		1	1	1	1	1	ND		0	1	0	0	1
PD			1	0	1	1	PD			1	1	0	1
D2t				1	0	0	D2t				0	0	1
D2					1	1	D2					0	1
D4						1	D4						1
D6							D6						

#### 4.5.5 Gen za glutathion S-transferazu

Relativna ekspresija gena za glutathion S-transferazu (*GST*) se razlikuje između eksperimentalnih grupa (Grafik 20). U poređenju sa kontrolnom grupom ekspresija *GST* se ne razlikuje značajno, sem u grupama PD i D2, kod kojih je značajno smanjena.



**Grafik 20.** Relativna ekspresija gena za glutathion S-transferazu. Rezultati su prikazani u odnosu na kontrolu (ND=0) i izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška dobijena za 3 nezavisna pula (masno telo 5 gusenica činilo je jedan pul).

Kod larvi u dijapauzi na niskoj temperaturi (D2–D4) relativna ekspresija *GST* je najniža početkom dijapauze (D2) i postepeno raste tokom dijapauze dostižući nivo ekspresije ND grupe (D6).

Takođe, na Grafiku 20 se može uočiti da je ekspresija *GST*, iako smanjena početkom dijapauze, značajno veća kod dijapauzirajuće grupe na višoj temperaturi (D2t) u poređenju sa grupom na nižoj temperaturi (D2).

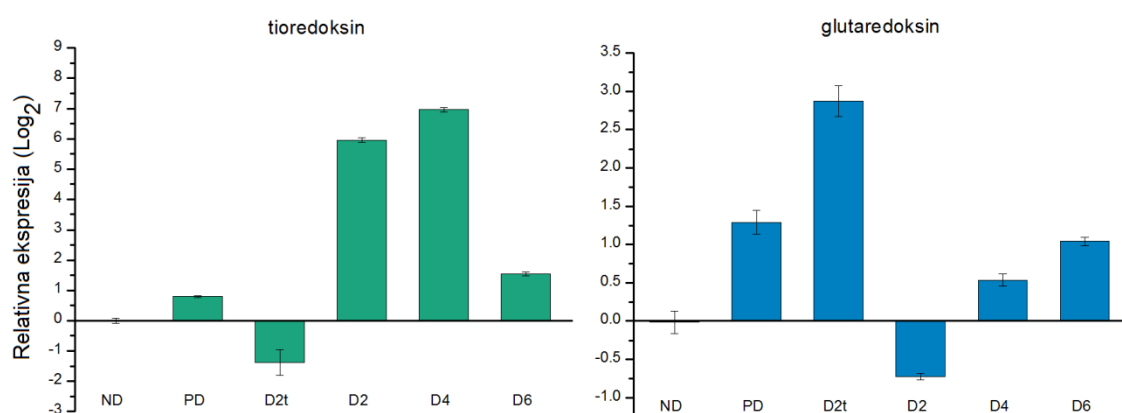
Statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ , Bonferonijev test) između eksperimentalnih grupa prikazane su u Tabeli 21, dok su srednje vrednosti i standardne greške prikazane u Tabeli 35 u Prilozima.

**Tabela 21.** Relativna ekspresija gena za glutation *S*-transferazu u masnom telu larvi *O. nubilalis* – jednofaktorska ANOVA i *post hoc* Bonferonijev test za nivo značajnosti od  $p < 0,05$  (1 – značajno, 0 – nije statistički značajno).

	ND	PD	D2t	D2	D4	D6
ND		1	0	1	0	0
PD			0	0	1	1
D2t				1	0	0
D2					1	1
D4						0
D6						

#### 4.5.6 Geni za tioredoksin i glutaredoksin

Relativna ekspresija gena za tioredoksin (*Trx*) i glutaredoksin (*Grx*) se značajno razlikuje kako između eksperimentalnih grupa, tako i između analiziranih gena redoksina (Grafik 21).



**Grafik 21.** Relativna ekspresija gena za tioredoksin i glutaredoksin. Rezultati su prikazani u odnosu na kontrolu (ND=0) i izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška dobijena za 3 nezavisna pula (masno telo 5 gusenica činilo je jedan pul).

U odnosu na ND grupu, ekspresija gena za tioredoksin je povećana kod larvi koje su u dijapauzi na nižoj temperaturi (D2, D4, D6), dok je kod D2t larvi ekspresija smanjena. Gen za tioredoksin nema karakterističan obrazac povećanja ekspresije tokom dijapauze, koji je karakterističan za većinu analiziranih gena. Naprotiv, njegova relativna ekspresija je do četvrtog meseca dijapauze značajno povećana, najviše od svih analiziranih gena, da bi potom pred kraj dijapauze opala, ali bila i dalje na višem nivou u odnosu na ND grupu (Grafik 21).

Ekspresija gena za glutaredoksin je povećana kod larvi iz PD, D2t i D6 grupa, nepromenjena kod larvi iz D4 grupe i smanjena kod larvi iz D2 grupe u odnosu na ND grupu. Za razliku od tioredoksina, glutaredoksin ima karakterističan obrazac

povećanja ekspresije tokom dijapauze na niskoj temperaturi (D2, D4, D6) – smanjena je na početku i postepeno se povećava tokom dijapauze. Takođe, ekspresija gena za glutaredoksin je najviša kod larvi iz D2t grupe i znatno je viša u odnosu na dijapauzirajuće larve iste starosti, ali na nižoj temperaturi (D2).

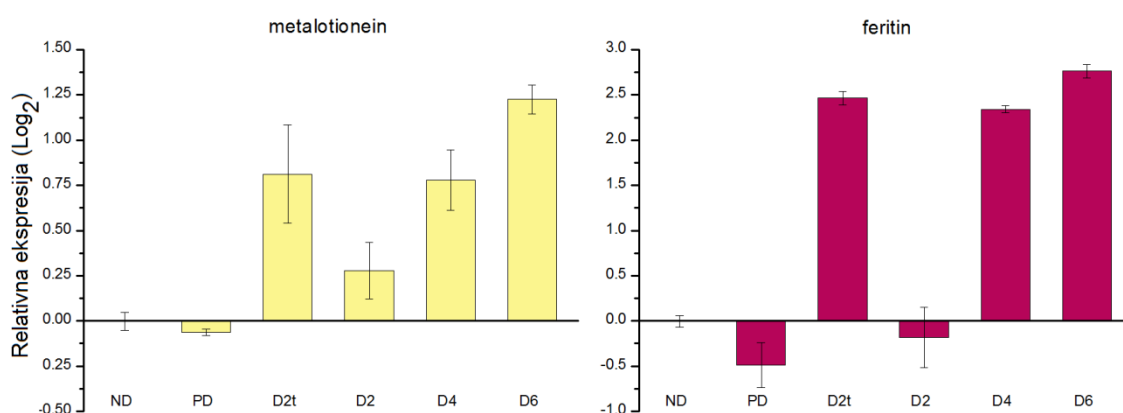
Statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ , Bonferonijev test) između eksperimentalnih grupa prikazane su u Tabeli 22, dok su srednje vrednosti i standardne greške prikazane u Tabeli 35 u Prilozima.

**Tabela 22.** Relativna ekspresija gena za tioredoksin (a) i glutaredoksin (b) u masnom telu larvi *O. nubilalis* – jednofaktorska ANOVA i *post hoc* Bonferonijev test za nivo značajnosti od  $p < 0,05$  (1 – značajno, 0 – nije statistički značajno).

a) tioredoksin							b) glutaredoksin						
	ND	PD	D2t	D2	D4	D6		ND	PD	D2t	D2	D4	D6
ND		0	1	1	1	1	ND		1	1	1	0	1
PD			1	1	1	0	PD			1	1	1	0
D2t				1	1	1	D2t				1	1	1
D2					1	1	D2					1	1
D4						1	D4						0
D6							D6						

#### 4.5.7 Geni za metalotionein i feritin

Relativna ekspresija gena za metalotionein (*Mtn*) i feritin (*Fer*) ima sličan obrazac, s tim da je ekspresija gena za feritin veća (Grafik 22). U odnosu na ND grupu, oba gena imaju značajno povećanu ekspresiju u svim grupama, sem kod PD i D2 larvi, kod kojih ekspresija nije značajno promenjena.



**Grafik 22.** Relativna ekspresija gena za metalotionein i feritin. Rezultati su prikazani u odnosu na kontrolu (ND=0) i izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška dobijena za 3 nezavisna pula (masno telo 5 gusenica činilo je jedan pul).

Kod dijapauzirajućih larvi na niskoj temperaturi (D2, D4, D6), relativna ekspresija oba gena ima karakterističan obrazac – najniža je početkom dijapauze i nije značajno promenjena u odnosu na ND grupu, a potom postepeno raste tokom dijapauze dostižući svoj maksimum pred kraj mirovanja (D4 i D6).

Takođe, ekspresija oba gena je visoka u D2t grupi i sličnog je nivoa kao ekspresija u grupama pred kraj dijapauze (D4 i D6). Međutim, samo ekspresija feritina je veća u D2t grupi, u odnosu na dijapauzirajuće larve iste starosti (D2), dok se ekspresija metalotioneina statistički značajno ne razlikuje među ovim grupama.



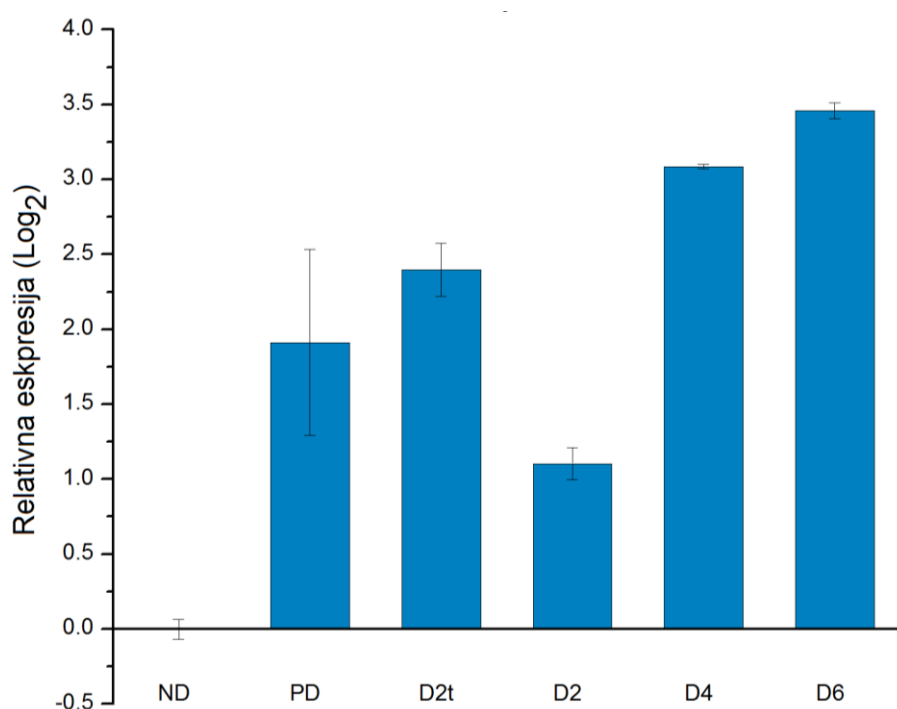
Statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ , Bonferonijev test) između eksperimentalnih grupa prikazane su u Tabeli 23, dok su srednje vrednosti i standardne greške prikazane u Tabeli 35 u Prilozima.

**Tabela 23.** Relativna ekspresija gena za metalotionein (a) i feritin (b) u masnom telu larvi *O. nubilalis* – jednofaktorska ANOVA i *post hoc* Bonferonijev test za nivo značajnosti od  $p < 0,05$  (1 – značajno, 0 – nije statistički značajno).

a) metalotionein							b) feritin						
	ND	PD	D2t	D2	D4	D6		ND	PD	D2t	D2	D4	D6
ND		0	1	0	1	1	ND		0	1	0	1	1
PD			1	0	1	1	PD			1	0	1	1
D2t				0	0	0	D2t				1	0	0
D2					0	1	D2					1	1
D4						0	D4						0
D6							D6						

#### 4.5.8 Gen za faktor nekroze tumora (*TNF*)

Relativna ekspresija gena za faktor nekroze tumora (*TNF*) se statistički značajno razlikuje između eksperimentalnih grupa (Grafik 23). U odnosu na ND grupu ekspresija ovog gena je povećana kod svih eksperimentalnih grupa, s tim da to povećanje nije statistički značajno na početku dijapauze (D2).



**Grafik 23.** Relativna ekspresija gena za faktor nekroze tumora (*TNF*). Rezultati su prikazani u odnosu na kontrolu (ND=0) i izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška dobijena za 3 nezavisna pula (masno telo 5 gusenica činilo je jedan pul).

Kod dijapauzirajućih larvi aklimatizovanih na nisku temperaturu (D2, D4, D6), relativna ekspresija *TNF* je najniža početkom dijapauze i povećava se tokom dijapauze (D4 i D6). Takođe, ekspresija *TNF* se ne razlikuje statistički značajno

između dijapauzirajućih larvi na višoj temperaturi (D2t) i larvi koje su na nižoj temperaturi (D2, D4, D6).

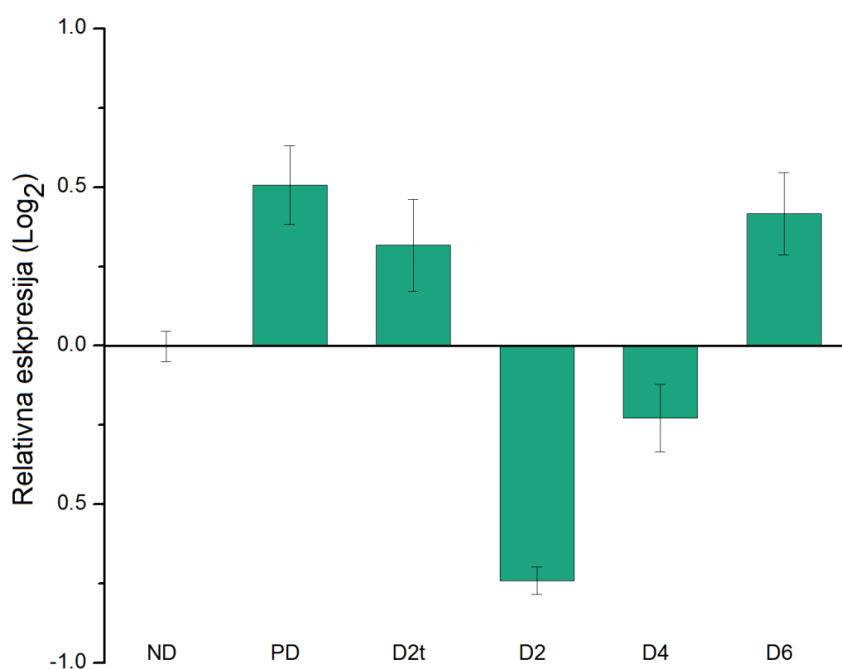
Statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ , Bonferonijev test) između eksperimentalnih grupa prikazane su u Tabeli 24, dok su srednje vrednosti i standardne greške prikazane u Tabeli 35 u Prilozima.

**Tabela 24.** Relativna ekspresija gena faktora nekroze tumora (*TNF*) masnom telu larvi *O. nubilalis* – jednofaktorska ANOVA i *post hoc* Bonferonijev test za nivo značajnosti od  $p < 0,05$  (1 – značajno, 0 – nije statistički značajno).

	ND	PD	D2t	D2	D4	D6
ND		1	1	0	1	1
PD			0	0	0	1
D2t				0	0	0
D2					1	1
D4						0
D6						

#### 4.5.9 Gen za inhibitor Bax proteina

Relativna ekspresija gena inhibitora Bax proteina je niska kod svih grupa i ne razlikuje se statistički značajno u odnosu na ND, osim kod D2 larvi kod kojih je smanjena (Grafik 24).

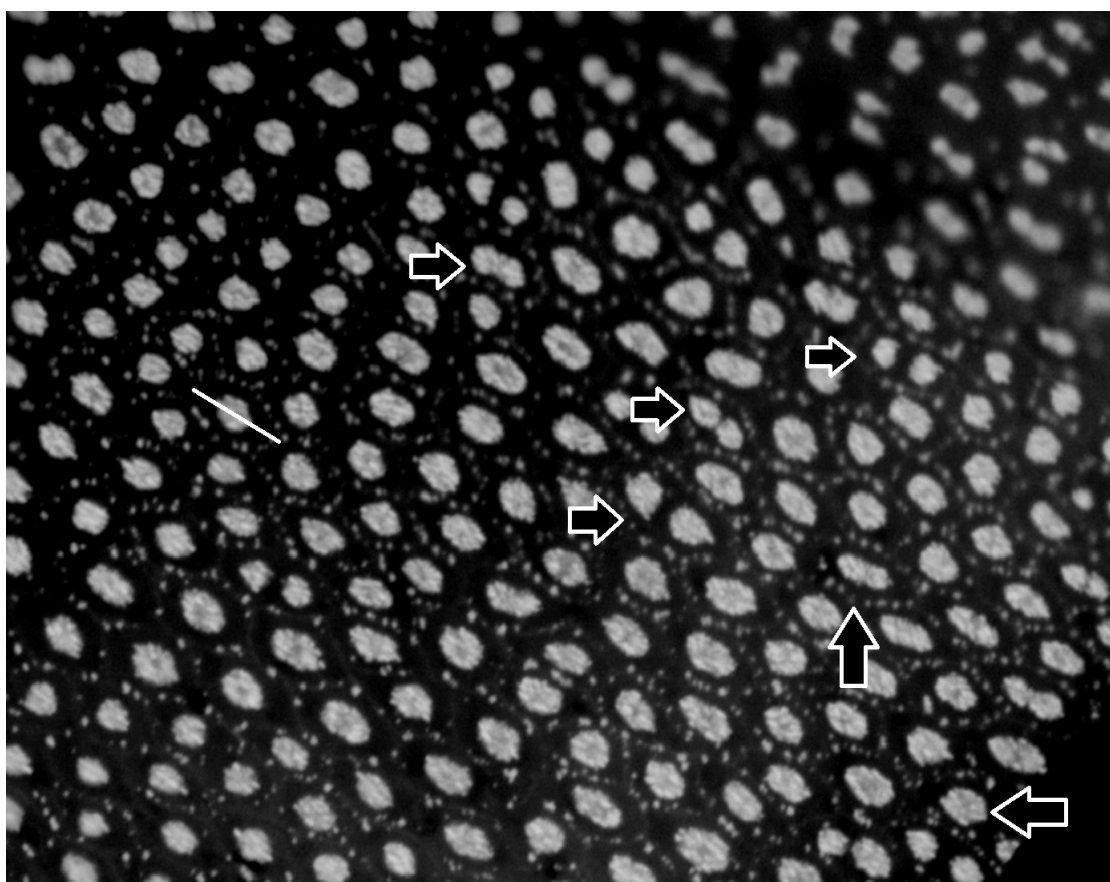


**Grafik 24.** Relativna ekspresija gena inhibitora Bax proteina. Rezultati su prikazani u odnosu na kontrolu (ND=0) i izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška dobijena za 3 nezavisna pula (masno telo 5 gusenica činilo je jedan pul).

Relativna ekspresija je najviša u PD i D6 grupi, s tim da ima karakterističan obrazac postepenog povećavanja tokom dijapauze na niskoj temperaturi (D2, D4, D6). Takođe, ekspresija gena inhibitora Bax proteina kod dijapauzirajućih larvi iste starosti (D2t i D2), ali aklimatizovanih na različitim temperaturama, značajno se razlikuje. Srednje vrednosti i standardne greške prikazane su u Tabeli 35 u Prilozima.

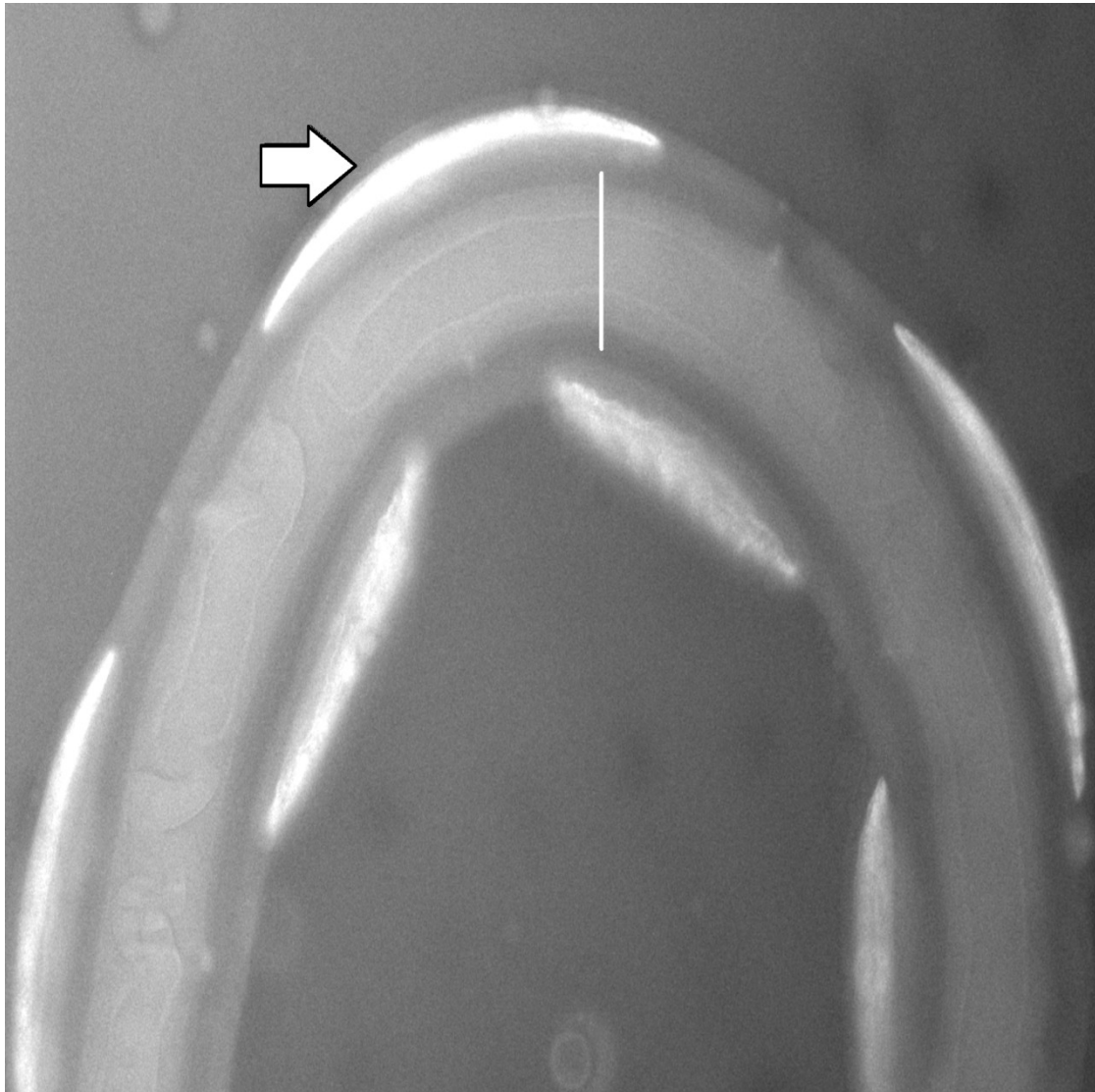
#### 4.6 Fluorescentna mikroskopija

Sa ciljem da se proveriti postojanje apoptotskih promena na morfološkom nivou, larvalna tkiva bojena su *ex vivo* fluorescentnom DAPI bojom koja se vezuje za DNK. Na Slici 19 prikazan je epidermis sa kutikulom, koji je očuvanih morfoloških karakteristika. Mogu se uočiti očuvane epidermalne ćelije sa jedrom, koje dominira u centralnom delu ćelije, i mitohondrijama, koje se nalaze uz ivicu ćelije.



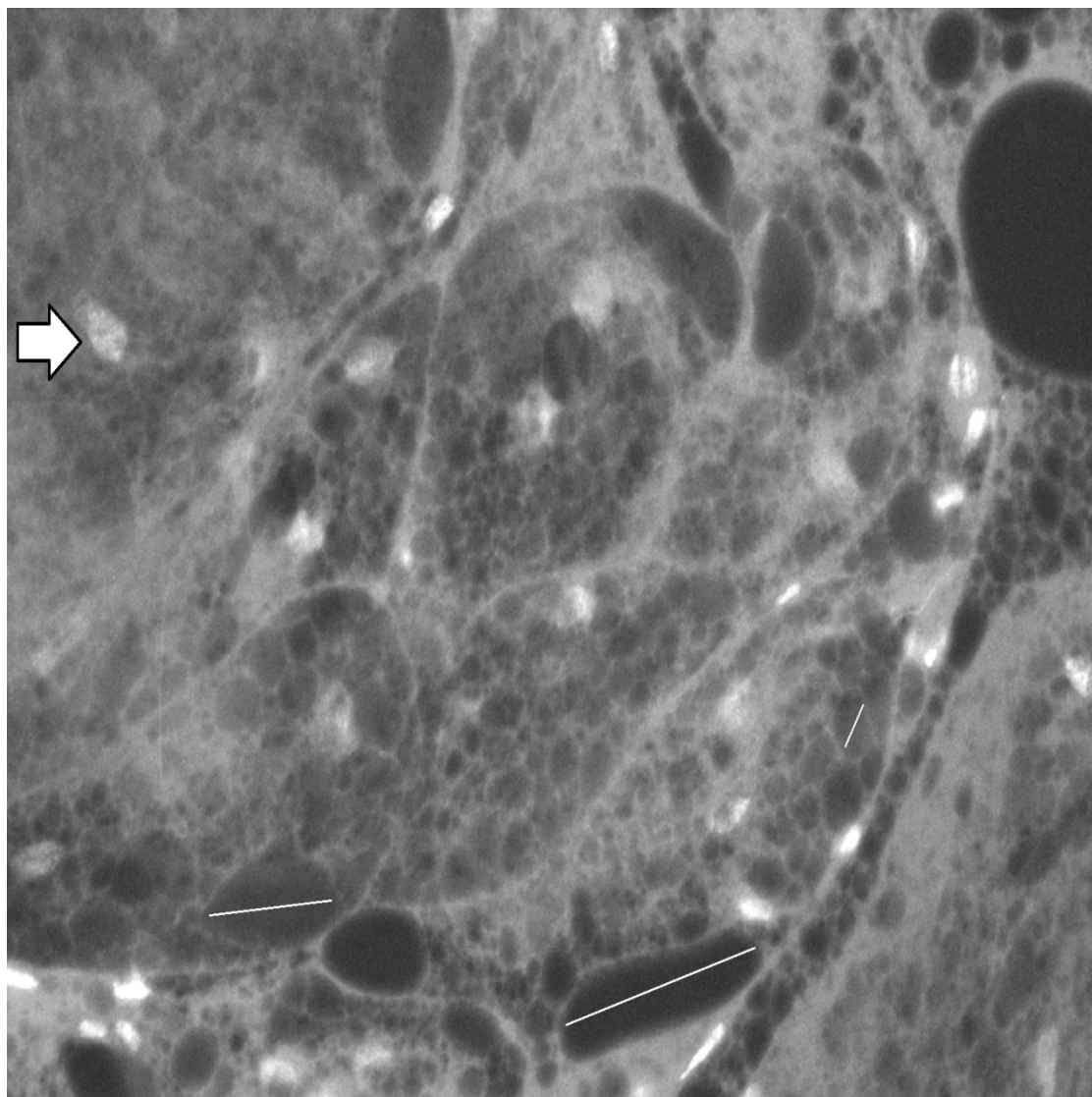
**Slika 19.** Epidermis sa kutikulom dijapauzirajućih larvi *O. nubilalis* obojen fluorescentnom DAPI bojom, snimljen pod uvećanjem od 40 puta. Slika je prikazana u crno-beloj formi, inverzno, zbog bolje vidljivosti epidermalnih ćelija. Bela linija označava prečnik tipične epidermalne ćelije, strelica na levo pokazuje centralno postavljeno jedro, a strelica na gore periferno postavljene mitohondrije u epidermalnoj ćeliji. Strelice na desno pokazuju epidermalne ćelije zaustavljene u različitim fazama ćelijske deobe (metafazi, anafazi i telofazi).

Na Slici 20 prikazan je deo očuvane svilene žlezde. Na slici je uočljiv lumen kanala svilene žlezde kao i epidermalne sekretorne ćelije sa izduženim jedrima.



**Slika 20.** Svilene žlezde dijapauzirajućih larvi *O. nubilalis* obojene fluorescentnom DAPI bojom, snimljene pod uvećanjem od 40 puta. Slika je prikazana u crno-belom formatu zbog bolje vidljivosti morfoloških detalja. Strelica na desno pokazuje izduženo jedro epidermalne ćelije, a prava crta označava prečnik lumena kanala žlezde.

Na Slici 21 predstavljeno je morfološki očuvano masno telo dijapauzirajućih larvi.

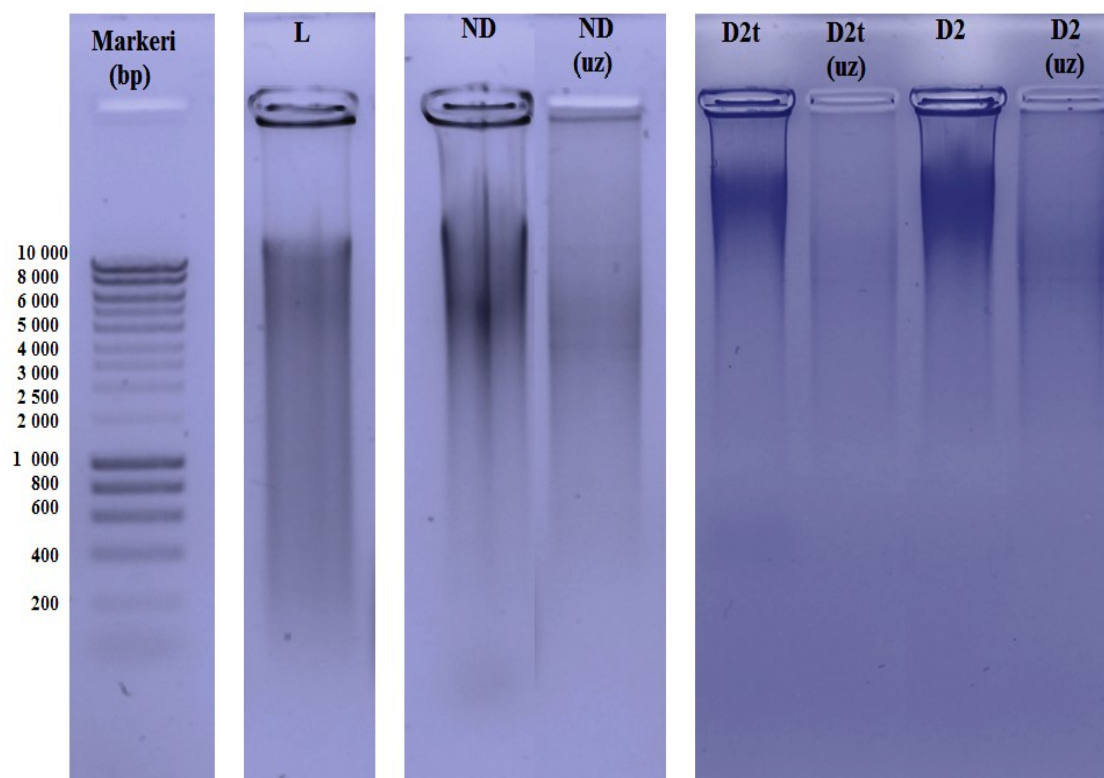


**Slika 21.** Adipociti iz masnog tela dijapauzirajućih larvi *O. nubilalis* obojeni fluorescentnom DAPI bojom, snimljeni pod uvećanjem od 40 puta. Slika je prikazana u crno-belom formatu zbog bolje vidljivosti adipocita. Strelica na desno pokazuje jedro, a linije označavaju prečnike pojedinih masnih kapljica u adipocitima.

Na Slici 21 se mogu uočiti adipociti u kojima se nalazi jedro i brojne masne kapljice različitih veličina, koje dominiraju. Različita veličina masnih kapljica ukazuje na intenzivnu lipolizu koja se odvija tokom dijapauze.

#### 4.7 Esej fragmentisanosti DNK

Kako bi se ispitalo postojanje apoptotskih promena na biohemijskom nivou, urađen je esej fragmentisanosti (očuvanosti) ukupne DNK (Slika 22).



**Slika 22.** Elektroforeza ukupne DNK izolovane iz lutki i larvi (L – lutke, ND – nedijapauzirajuće gusenice, D2t – dva meseca u dijapauzi na 22°C, D2 – dva meseca u dijapauzi na 5°C, uz – tretman ultrazvukom). Objašnjenje je dato u tekstu.

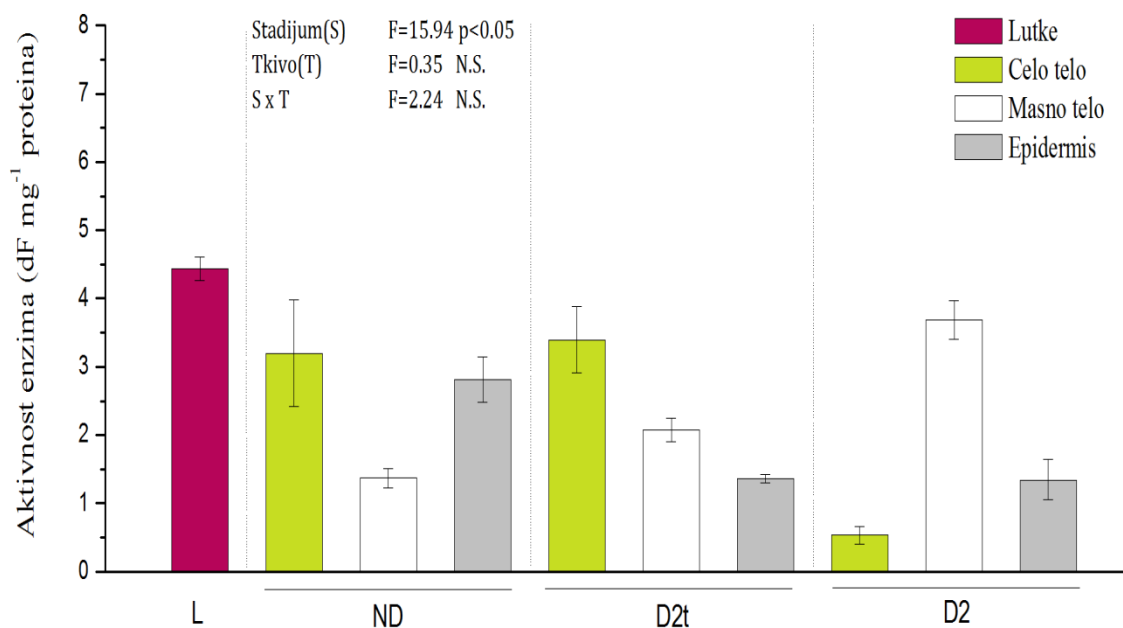
Na Slici 22 može se uočiti izražena fragmentisanost ukupne DNK iz lutki i nedijapauzirajućih larvi. DNK iz dijapauzirajućih larvi nije fragmentisana, sem nakon tretmana ultrazvukom, koji je predstavljao vid pozitivne kontrole.



## 4.8 Aktivnost kaspaza

### 4.8.1 Aktivnost kaspazi 9 sličnih enzima

Fluorimetrijska analiza pokazala je da je aktivnost kaspazi 9 sličnih enzima najviša u homogenatu lutki i da se statistički značajno razlikuje u odnosu na nedijapauzirajuće i dijapauzirajuće larve (Grafik 25).



**Grafik 25.** Kaspazi 9 slična specifična aktivnost u homogenatu lutki (L), larvi (ND, D2t i D) i u larvalnim tkivima (masno telo i epidermis sa kutikulom). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška dobijena za 3 nezavisna pula. Statistička značajnost analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) i *post hoc* Bonferonijevim testom ( $p < 0,05$ ) za faktore (F) stadijuma i tkiva, kao i njihove interakcije (N.S. – nije značajno).

Aktivnost enzima sličnih kaspazi 9 se ne razlikuje statistički značajno, niti između nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih grupa larvi, niti između dijapauzirajućih grupa međusobno (D2t i D2).

Rezultati dvofaktorske analize (Tabela 25), efekta stadijuma i tkiva, kao i *post hoc* Bonferonijevog testa su pokazali da ne postoji statistički značajna razlika između aktivnosti kaspazi 9 sličnih enzima u različitim tkivima, kao ni značajna interakcija između faktora. Međutim, u različitim životnim stadijumima aktivnost ovih enzima se statistički značajno razlikuje.

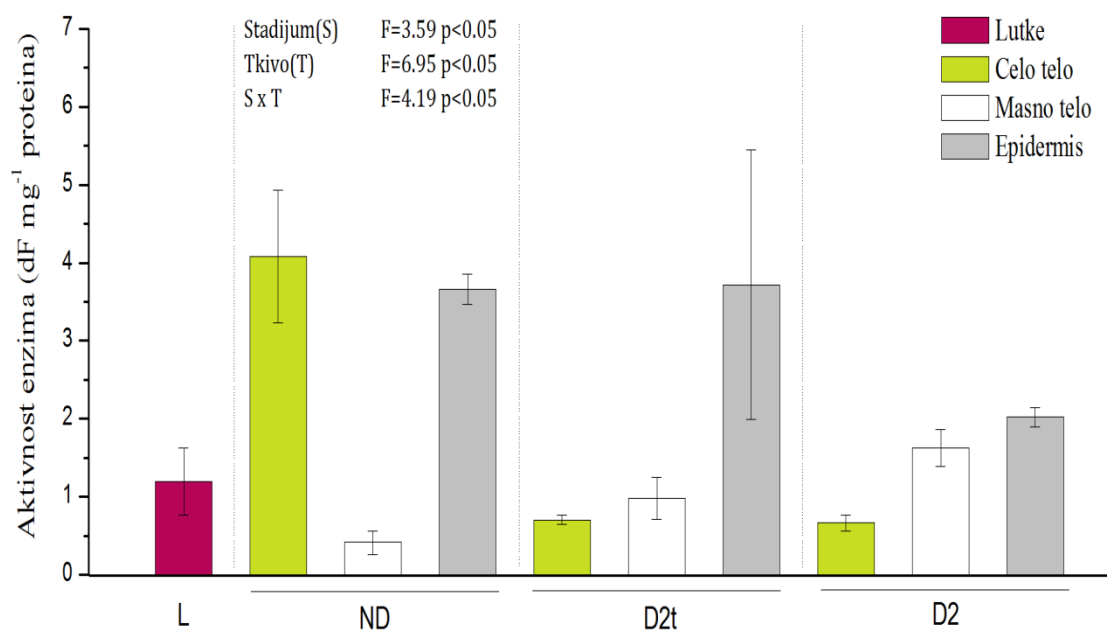
**Tabela 25.** Dvofaktorska analiza varijanse (ANOVA) aktivnosti kaspazi 9 sličnih enzima u različitim tkivima (faktor T) i životnim stadijumima (faktor S) kukuruznog plamenca, *O. nubilalis* (\*nivo značajnosti  $p < 0,05$ ; N.S. – nije značajno)

	stepen slobode	suma kvadrata	srednja vredost kvadrata	F	p
Stadijum (S)	3	95,99	32,00	15,94*	$3,67 \times 10^{-6}$
Tkivo (T)	2	1,39	0,70	0,35 <sup>N.S.</sup>	0,71
Interakcija (SxT)	6	26,94	4,49	2,24 <sup>N.S.</sup>	0,07
Greška	27	54,19	2,01	--	--

Srednje vrednosti i standardne greške za aktivnost kaspazi 9 sličnih enzima u svim eksperimentalnim grupama prikazane su u Tabeli 36 u Prilozima.

#### 4.8.2 Aktivnost kaspazi 8 sličnih enzima

Fluorimetrijska analiza pokazala je da se aktivnost kaspazi 8 sličnih enzima razlikuje između analiziranih grupa (Grafik 26).



**Grafik 26.** Kaspazi 8 slična specifična aktivnost u homogenatu lutki (L), larvi (ND, D2t i D) i u larvalnim tkivima (masno telo i epidermis sa kutikulom). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška dobijena za 3 nezavisna pula. Statistička značajnost analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) i *post hoc* Bonferonijevim testom ( $p < 0,05$ ) za faktore (F) stadijuma i tkiva, kao i njihove interakcije.

Rezultati dvofaktorske analize (Tabela 26), efekta stadijuma i tkiva, i *post hoc* Bonferonijevog testa su pokazali da postoji statistički značajna razlika između aktivnosti kaspazi 8 sličnih enzima u različitim tkivima i stadijumima kukuruznog plamenca.

Statistički značajno se razlikuje aktivnost kaspazi 8 sličnih enzima između ND grupe i lutki, dok se između nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih larvi, kao ni lutki i dijapauzirajućih larvi, aktivnost ovih enzima ne razlikuje.

Dalje, postoji statistički značajna razlika između aktivnosti enzima u masnom telu i epidermisu sa kutikulom, u kome je aktivnost povećana (Grafik 26). Takođe, dvofaktorska ANOVA aktivnosti kaspazi 8 sličnih enzima je pokazala da postoji značajna interakcija između faktora stadijuma i tkiva (Tabela 26).

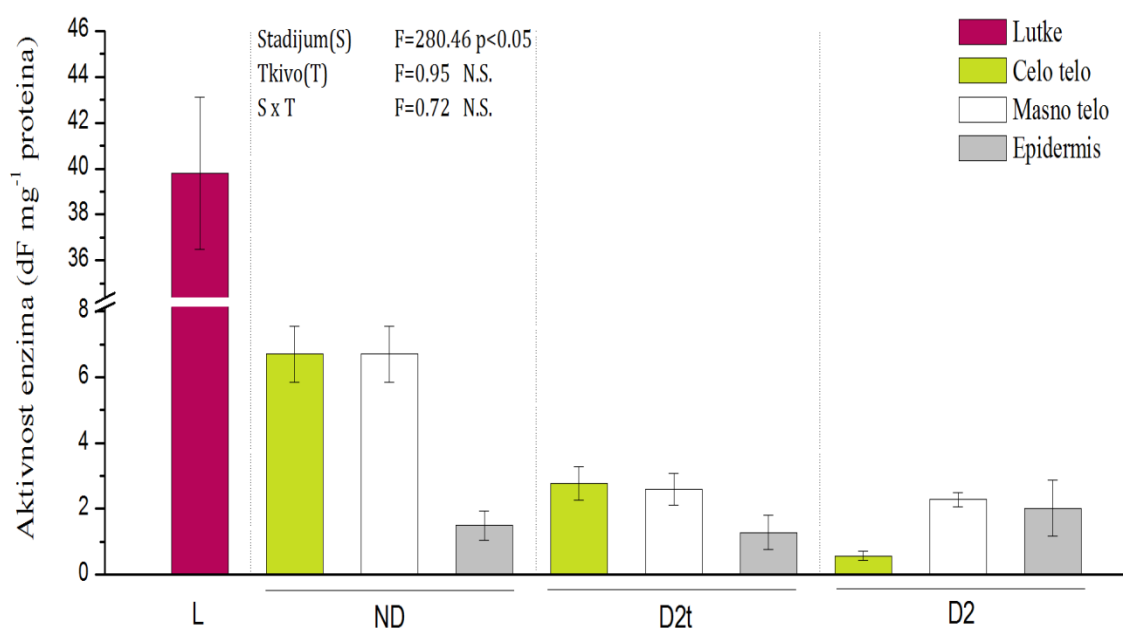
**Tabela 26.** Dvofaktorska analiza varijanse (ANOVA) aktivnosti kaspazi 8 sličnih enzima u različitim tkivima (faktor T) i životnim stadijumima (faktor S) kukuruznog plamenca, *O. nubilalis* (\*nivo značajnosti  $p < 0,05$ ).

	stepen slobode	suma kvadrata	srednja vrednost kvadrata	F	p
Stadijum (S)	3	12,06	4,02	3,59*	$2,84 \times 10^{-2}$
Tkivo (T)	2	15,57	7,78	6,95*	$4,17 \times 10^{-3}$
Interakcija (SxT)	6	28,19	4,70	4,19*	$5,06 \times 10^{-3}$
Greška	24	26,89	1,12	--	--

Srednje vrednosti i standardne greške za aktivnost kaspazi 8 sličnih enzima u svim eksperimentalnim grupama prikazane su u Tabeli 36 u Prilozima.

### 4.8.3 Aktivnost kaspazi 3 sličnih enzima

Fluorimetrijska analiza pokazala je da je aktivnost kaspazi 3 sličnih enzima najviša u homogenatu lutki i da se značajno razlikuje u odnosu na nedijapauzirajuće i dijabauzirajuće larve (Grafik 27).



**Grafik 27.** Kaspazi 3 slična specifična aktivnost u homogenatu lutki (L), larvi (ND, D2t i D) i u larvalnim tkivima (masno telo i epidermis sa kutikulom). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška dobijena za 3 nezavisna pula. Statistička značajnost analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) i *post hoc* Bonferonijevim testom ( $p < 0,05$ ) za faktore (F) stadijuma i tkiva, kao i njihove interakcije (N.S. – nije značajno).

Aktivnost kaspazi 3 sličnih enzima ne razlikuje se statistički značajno ni između nedijapauzirajuće i dijabauzirajućih grupa, niti između dijabauzirajućih grupa međusobno (D2t i D2).

Rezultati dvofaktorske analize (Tabela 25), efekta stadijuma i tkiva, i *post hoc* Bonferonijevog testa su pokazali da ne postoji statistički značajna razlika između aktivnosti kaspazi 3 sličnih enzima u različitim tkivima, kao ni značajna interakcija između faktora stadijuma i tkiva.

Srednje vrednosti i standardne greške aktivnosti kaspazi 3 sličnih enzima u svim eksperimentalnim grupama prikazane su u Tabeli 36 u Prilozima.

**Tabela 27.** Dvofaktorska analiza varijanse (ANOVA) aktivnosti kaspazi 3 sličnih enzima u različitim tkivima (faktor T) i životnim stadijumima (faktor S) kukuruznog plamenca, *O. nubilalis* (\*nivo značajnosti  $p < 0,05$ ; N.S. – nije značajno).

	stepen slobode	suma kvadrata	srednja vrednost kvadrata	F	p
Stadijum (S)	3	9 210,09	3 070,03	280,46*	0
Tkivo (T)	2	20,89	10,44	0,95 <sup>N.S.</sup>	0,40
Interakcija (SxT)	6	47,42	7,90	0,72 <sup>N.S.</sup>	0,64
Greška	24	262,71	10,95	--	--

#### 4.8.4 Relativna aktivnost kaspaza

Poređenjem aktivnosti kaspaza iz različitih homogenata sa aktivnošću u kontrolnoj grupi (L) dobijena je relativna aktivnost (Tabela 28).

**Tabela 28.** Relativna aktivnost kaspazama sličnih enzima u homogenatu celih larvi i tkivima (masno telo i epidermis sa kutikulom) u odnosu na aktivnost u homogenatu lutki *O. nubilalis* (100%).

Tkivo	Grupa	Kaspaza 9 (%)	Kaspaza 8 (%)	Kaspaza 3 (%)
Celo telo larvi	ND	57,50	340,84	16,83
	D2t	61,02	58,82	6,93
	D2	9,54	55,80	1,43
Masno telo	ND	24,61	34,80	17,96
	D2t	37,28	81,91	6,52
	D2	66,30	136,08	5,72
Epidermis sa kutikulom	ND	50,57	306,08	3,75
	D2t	24,41	310,90	3,21
	D2	24,14	168,91	5,08

Aktivnost svih kaspaza u celom telu larvi iz D2 grupe je niža u poređenju sa ND i D2t larvama (Tabela 28). U masnom telu je suprotno, višu relativnu aktivnost imaju inicijatorske kaspaze u dijapauzirajućoj grupi D2, u odnosu na ND i D2t.

Sa druge strane, relativna aktivnost kaspazi 3 sličnih enzima ima nižu aktivnost u dijapauzirajućim larvama, u poređenju sa ND. U epidermisu sa kutikulom najvišu relativnu aktivnost imaju kaspazi 8 slični enzimi, a najnižu kaspazi 3 slični enzimi (Tabela 28).

Statistička značajnost logaritamskih vrednosti relativne aktivnosti analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) i *post hoc* Bonferonijevim testom ( $p < 0,05$ ) za faktore (F) stadijuma i tkiva, kao i njihove interakcije (Tabela 29). Rezultati dvofaktorske ANOVA su pokazali da je relativna aktivnost kaspazi 9 sličnih enzima značajno smanjena u dijapauzirajućim larvama na nižoj temperaturi (D2) grupa, u odnosu na ND i D2t grupu. Takođe, dvofaktorska analiza nije

pokazala značajnu razliku između aktivnosti kaspazi 9 sličnih enzima po tkivima. Međutim, pokazala je značajnost u interakciji faktora stadijuma i tkiva.

Sa druge strane, rezultati dvofaktorske ANOVA za relativnu aktivnost kaspazi 8 sličnih enzima su pokazali da nema značajne razlike između ND i dijapauzirajućih grupa, ali da postoji značajno povišena aktivnost ovih enzima u epidermisu u odnosu na masno telo. Takođe, nije utvrđena značajnost u interakciji između faktora stadijuma i tkiva (Tabela 29).

Dalje, dvofaktorska analiza pokazala je da je aktivnost kaspazi 3 sličnih enzima značajno manja u D2 grupi u odnosu na ND, ali da se ne razlikuje među dijapauzirajućim grupama (D2t i D2). Relativna aktivnost kaspazi 3 sličnih enzima je značajno manja u epidermisu u odnosu na masno telo. Takođe, postoji statistički značajna interakcija između dva analizirana faktora – stadijuma i tkiva larvi (Tabela 29).

**Tabela 29.** Dvofaktorska analiza varijanse (ANOVA) relativne aktivnosti kaspaza u različitim stadijumima (faktor 1) i tkivima (faktor 2) *O. nubilalis* (\*nivo značajnosti  $p < 0,05$ ; N.S. – nije značajno).

relativna aktivnost		stepen slobode	suma kvadrata	srednja vrednost kvadrata	F	p
kaspaza 9	Stadijum (S)	2	0,28	0,14	13,90*	$2,24 \times 10^{-4}$
	Tkivo (T)	2	0,07	0,03	3,43 <sup>N.S.</sup>	$5,47 \times 10^{-2}$
	Interakcija (SxT)	4	1,50	0,37	37,27*	$1,77 \times 10^{-8}$
	Greška	18	0,18	0,01	--	--
kaspaza 8	Stadijum (S)	2	0,12	0,06	0,37 <sup>N.S.</sup>	0,70
	Tkivo (T)	2	1,37	0,68	4,26*	0,03
	Interakcija (SxT)	4	1,77	0,44	2,77 <sup>N.S.</sup>	0,06
	Greška	18	2,88	0,16	--	--
kaspaza 3	Stadijum (S)	2	1,19	0,60	6,70*	$6,7 \times 10^{-3}$
	Tkivo (T)	2	0,86	0,43	4,81*	$2,12 \times 10^{-2}$
	Interakcija (SxT)	4	1,08	0,27	3,02*	$4,57 \times 10^{-2}$
	Greška	18	1,60	0,09	--	--



## **5. DISKUSIJA**

## 5.1 Metaboličke promene tokom dijapauze

Ulazak organizma u dijapauzu, hipometaboličko stanje, praćen je postepenim smanjenjem opšte metaboličke aktivnosti i istovremenom pripremom organizma za preživljavanje u nepovoljnim uslovima sredine.

### 5.1.1 Sadržaj ukupne telesne vode u dijapauzi

Ukupna količina vode koja je izmerena kod nedijapauzirajućih grupa (ND i PD) je slična i kreće se oko 65%, što je u skladu sa prosečnom količinom vode kod insekata (Hadley, 1994a). Sličan sadržaj ukupne vode među ND i PD larvama može se objasniti time što su ove larve iste starosti, gajene u sličnim uslovima i da predijapauzirajuća grupa nije u dijapauzi.

Kod dijapauzirajućih grupa sadržaj ukupne vode je manji u odnosu na nedijapauzirajuće grupe i smanjuje se sa trajanjem dijapauze. Larve su tokom dijapauze izložene procesu dehidracije zbog toga što troše vodu za održavanje metaboličkih procesa; voda postepeno isparava iz organizma, a larve ne unose nove količine putem ishrane. U dijapauzi sadržaj ukupne vode opada za 20 do 30%; najmanji je kod dijapauzirajućih larvi na 22°C (D2t) i za čak 10–20% je manji u odnosu na larve iz D2 grupe koje su takođe dva meseca u dijapauzi, ali na 5°C. Dalje, u larvama koje miruju na nižoj temperaturi uočen je sporiji gubitak od 5–10% ukupne vode tokom šest meseci. Ovakvi rezultati ukazuju da je izlaganje larvi niskim temperaturama veoma važno za razvoj mehanizama zaštite od dehidracije.

Niska temperatura na nekoliko načina može uticati na smanjenje dehidracije. Prvo, na nižoj temperaturi voda sporije isparava, drugo, stopa metaboličkih procesa je takođe smanjena, a samim tim i potrebe za vodom. Treće, izlaganjem niskim temperaturama pokreće se izmena metaboličkih procesa u pravcu sinteze zaštitnih molekula, između ostalih, veoma polarnih, hidrofilnih i osmotski aktivnih kao što su glicerol, trehaloza, sorbitol i dr.

Ulaskom u hipometabolizam larve kukuruznog plamenca smanjuju i intenzitet disanja nekoliko puta, kako su to utvrdili Beck i Hanec (1960). Smanjenje disanja odražava se i na očuvanje vode, zbog toga što se prilikom razmene gasova nakon otvaranja spirakuluma završnih trahejnih kanala odaje velika količina vode. Smatra se da se čak 20% izgubljene vode otpušta tokom respiracije (Hadley, 1994a; Hadley, 1994b).

Dalje, smanjenjem opšte metaboličke stope, larve ne samo da troše manje vode nego i duže čuvaju zalihe metaboličke vode. Naime, bogate rezerve metaboličke vode nalaze se u glikogenu i lipidima, međutim, kako se tokom lipolize deo vode i utroši, nakon razgradnje glikogena ostaje više metaboličke vode (Edney, 1977; Hadley, 1994a). U ranijim kriobiološkim studijama na *O. nubilalis* utvrđeno je da je razgradnja glikogena, koji služi kao najvažniji izvor glukoze za sintezu glicerola, intenzivna početkom dijapauze, na niskim temperaturama (Grubor-Lajšić i dr., 1991). Sintaza zaštitnih molekula, pokrenuta delovanjem niskih temperatura, takođe daje svoj doprinos očuvanju sadržaja vode. Naime, ovi molekuli, koji su najčešće polihidroksilni i osmotski veoma aktivni, za sebe vezuju molekule vode i prevode je iz osmotski aktivne u osmotski neaktivnu formu. Zapravo, zbog svoje polarnosti, ovi metaboliti se takmiče sa molekulima vode za formiranje vodoničnih veza i na taj način smanjuju slobodnu Gibsovu energiju molekula vode i njihovu sposobnost da isparavaju (Hadley, 1994a), kako je i dokazano u ovoj disertaciji u eksperimentu sa dodavanjem glicerola u hemolimfu nedijapauzirajućih larvi kukuruznog plamenca.

Da niske temperature tokom mirovanja povoljno deluju na očuvanje energetske zaliha i preživljavanje organizma potvrđeno je velikom smrtnošću insekata pri izlaganju visokim temperaturama. Jedinke insekatskih vrsta, *Diplolepis spinosa* i *Eurosta solidaginis*, koje su bile izložene visokim temperaturama imale su više stope metabolizma i višu stopu smrtnosti u odnosu na jedinke na nižim temperaturama (Williams i dr., 2003; Irwin i Lee, 2000). Slična pojava je uočena i kod larvi *O. nubilalis* iz D2t grupe, koje, verovatno zbog intenzivnijeg metabolizma, brže gube vodu, brže troše energetske zalihe i prerano uginjavaju, za razliku od dijapauzirajućih larvi na nižim temperaturama.

Osim biohemijskih adaptacija za očuvanje vode, organizmi se mogu štititi od dehidracije lučenjem zaštitnih mehaničkih opni i iniciranjem karakterističnih kutikulskih promena koje se odvijaju u toku priprema za dijapauzu (Benoit, 2010). Larve kukuruznog plamenca se u prirodi tokom dijapauze nalaze u stabljici kukuruza i u svojevrsnoj svilenoj kapsuli koja ih štiti ne samo od dehidracije već i od drugih, potencijalno opasnih, faktora iz spoljašnje sredine.

### **5.1.2 Osmolalnost hemolimfe, promet vode i tačke superhlađenja tkiva**

Metodom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC) praćene su tačke superhlađenja i promet vode u različitim tkivima – hemolimfi, svilenim žlezdama, srednjem crevu, masnom telu i epidermisu sa kutikulom, a osmometrom je merena osmolalnost hemolimfe. Rezultati DSC analize su pokazali da se u dijapauzi količina OA vode smanjuje, a OI povećava.

Najstabilnije tkivo po pitanju količine i prometa vode je masno telo, kod koga je inače izmerena i najmanja količina vode. S obzirom na to da se u masnom telu nalaze velike rezerve masti, logično je da je sadržaj vode u ovom izrazito hidrofobnom tkivu najniži. Takođe, s obzirom na to da masno telo predstavlja organ u kome se najintenzivnije obavljaju metabolički procesi kod insekata i da je značajan kao jetra kod kičmenjaka (Xu i dr., 2012), izuzetno je važno da sadržaj vode u ovom tkivu bude što stabilniji kako bi se omogućila njegova homeostaza koja je važna za opstanak celog organizma.

Za razliku od masnog tela, sadržaj ukupne vode kao i odnos OA i OI vode, razlikuje se tokom dijapauze u ostalim analiziranim tkivima. Ipak, zajedničke pravilnosti u prometu vode mogu se uočiti i među ovim tkivima. Naime, sadržaj ukupne i OA vode je manji kod dijapauzirajućih larvi. Takođe, kod dijapauzirajućih larvi izmerena količina OI vode je povećana, što je u skladu sa ranijim studijama na insektima (Worland, 1996; Kojić i dr., 2010). Kao i kod sadržaja ukupne telesne vode, sličnost između ND i PD grupa se može objasniti time da su larve iz obe

grupe gajene u sličnim uslovima, da su se aktivno hranile i hranom unosile dovoljno tečnosti.

Nasuprot ND i PD grupi, kod dijavauzirajućih grupa sadržaj ukupne, OA i OI vode menja se u hemolimfi i srednjem crevu na jedan, a u svilenim žlezdama i epidermisu sa kutikulom na drugi način tokom mirovanja. Ipak, zajednička karakteristika promena u svim tkivima je smanjenje sadržaja ukupne i OA vode, a povećanje sadržaja OI frakcije. Smanjenje sadržaja ukupne i OA vode može se objasniti gladovanjem dijavauzirajućih larvi, a samim tim i nemogućnošću da se voda koja se troši u metabolizmu nadoknadi svežim zalihama iz hrane. Zbog toga su ove larve izložene postepenoj dehidraciji, što se odražava i na sadržaj vode u tkivima. Takođe, trend intenzivnije dehidracije uočen je u larvama koje miruju na višoj, u odnosu na larve na nižoj temperaturi. Dalje, zbog sinteze zaštitnih molekula, a pre svih glicerola i trehaloze, u larvama na nižoj temperaturi dolazi kako do preraspodele vode između OA i OI frakcije, tako i do redistribucije vode između različitih tkiva.

Povećana količina OI frakcije u dijavauzi je posledica kako sinteze polihidroksilnih komponenti koje prevode OA u OI frakciju, tako i gubitka dela slobodne vode i koncentrovanja citosolnih rastvoraka, koji takođe za sebe mogu vezati vodu i prevesti je u OI. Odnos OA:OI vode najbolje opisuje promene koje se događaju u tkivima tokom dijavauze. U svim tkivima ovaj odnos je viši kod nedijavauzirajućih larvi (3–15), u poređenju sa dijavauzirajućim grupama kod kojih opada, krećući se od 0,6 do 2, što je u skladu sa ranije dobijenim rezultatima kod *O. nubilalis* (Kojić i dr., 2010).

Svilene žlezde i epidermis sa kutikulom ne predstavljaju mesta čuvanja vode tokom dijavauze, već naprotiv, mesta gde se ekskrecijom i isparavanjem gubi velika količina slobodne vode. Zbog navedenih razloga promene u sastavu i distribuciji vode u svilenim žlezdama i epidermisu sa kutikulom odraz su opštih promena na nivou celog organizma – ukupna i OA voda imaju visok sadržaj u nedijavauzirajućim grupama (ND i PD), koji tokom dijavauze intenzivno opada na višoj (D2t) ili postepeno na nižoj temperaturi (D2, D4, D6). Sadržaj OI frakcije je u

dijapauzi povećan. Epidermis je po površini najveće tkivo i najviše je izloženo spoljašnjim faktorima, zbog čega se preko njega najintenzivnije odvija isparavanje. S tim u vezi je i sadržaj vode u epidermisu sa kutikulom, koji je najniži u odnosu na ostala tkiva, što je verovatno posledica i toga da je epidermis tkivo koje nije u direktnom kontaktu sa hemolimfom. Osim toga, slično masnom telu, ispod epidermisa se nalazi sloj mišića sa potkožnim masnim tkivom gde se takođe može skladištiti određena količina hidrofobnih molekula (Canavoso i dr., 2001).

Najveće promene u količini vode događaju se u hemolimfi, cirkulatornom vezivnom tkivu larvi, ali i srednjem crevu koje često služi kao rezervoar vode tokom dijapauze (Hadley, 1994a). Obrazac prometa vode u ovim tkivima je veoma sličan i veoma karakterističan u odnosu na ostala analizirana tkiva. Hemolimfa ima najveći raspon promena u sadržaju vode, jer obliva sva tkiva i organe i predstavlja svojevrsnu pufer zonu stresa. U sastavu hemolimfe najveći deo čini voda, a kontrola njenog prometa je vitalna za održanje osmotske stabilnosti organizma i njegovo preživljavanje. S obzirom na to da se i procesi varenja u crevu odigravaju u tečnoj sredini, voda ima presudnu ulogu u održavanju funkcionalnosti digestivnog sistema. Zbog toga što se putem digestivnog trakta gubi velika količina vode, pažljiva regulacija prometa vode u ovom tkivu je od vitalnog značaja za organizam. Osim nedostupnosti hrane tokom dijapauze, ovo je verovatno još jedan od razloga zašto se larve kukuruznog plamenca ne hrane tokom mirovanja.

Količina ukupne i osmotski aktivne vode se u hemolimfi i srednjem crevu po ulasku u dijapauzu postepeno smanjuje, sve do četvrtog meseca dijapauze (D4), kada se uočava porast u njihovom sadržaju, a potom i ponovni pad (D6). Porast količine vode sredinom dijapauze u ovim tkivima je verovatno posledica dva istovremena procesa – povećanog prinosa metaboličke vode dobijene iz glikogenolize, a verovatno i iz lipolize, i intenzivne sinteze zaštitnih molekula (glicerola, trehaloze i dr.) koji utiču na redistribuciju vode između tkiva (Kojić i dr., 2010).

Larve *O. nubilalis* nakon izlaganja niskim temperaturama akumuliraju velike količine glicerola i trehaloze sredinom dijapauze (Grubor-Lajšić i dr., 1991; Kojić i

dr., 2010). Sinteza ovih metabolita, a pre svih glicerola, kod insekata se odvija u masnom telu odakle se izlučuju u hemolimfu, gde se ili čuvaju ili prenose do ostalih tkiva koja ih preuzimaju (Tsumuki i Kanehisa, 1978). Ovo potvrđuju i tačke superhlađenja analiziranih tkiva kukuruznog plamenca koje su najniže sredinom dijapauze (oko  $-25^{\circ}\text{C}$ ), kada je osmolalnost hemolimfe oko 1 800 mOsm/L, što je pet puta veće od osmolalnosti hemolimfe nedijapauzirajućih larvi.

Kod insekata koji tokom dijapauze bivaju izloženi niskim temperaturama, sinteza velike količine zaštitnih metabolita ima za cilj, osim smanjenja tačke mržnjenja, i prevođenje osmotski aktivne u neaktivnu frakciju vode, kao vid predostrožnosti od zamrzavanja telesnih tečnosti. Ova pojava je uočena kod mnogih insekata iz umerenog i subpolarnog klimatskog pojasa tokom prezimljavanja (Storey i Storey, 1991). Proizvodnja i količina zaštitnih metabolita često varira tokom sezone, jer je glavni pokretač njihove sinteze niska temperatura, što je i potvrđeno kod kukuruznog plamenca u *in vitro* studiji na masnom telu (Yi i dr., 1987). Insekti ne otpočinju sintezu poliola onda kada su izloženi temperaturama ispod nule, već naprotiv, sinteza otpočinje ranije, najintenzivnija je pod uticajem temperatura od  $5^{\circ}\text{C}$  do  $0^{\circ}\text{C}$  (Storey i Storey, 1988), a prati je istovremena glikogenoliza kao izvor glukoze (Bemani i dr., 2012).

Od svih zaštitnih metabolita glicerol verovatno ima najvažniju ulogu u otpornosti na niske temperature, jer, osim na sniženje tačke superhlađenja, utiče direktno i na redistribuciju vode između tkiva. Korišćenjem teške vode  $\text{D}_2\text{O}$ , ustanovljeno je da se u larvama leptira *Chillo supressallis* po izlaganju niskim temperaturama odvija razmena između vode i glicerola preko glicero-akvaporina – slobodna voda izlazi, a glicerol ulazi u masno telo (Izumi i dr., 2006).

Rezultai DSC analize tkiva larvi *O. nubilalis* su pokazali da u hemolimfi, i u manjoj meri u srednjem crevu, dolazi do povećanja količine vode sredinom dijapauze. Moguće objašnjenje ovog porasta je izlazak vode iz okolnih tkiva i istovremeni ulazak glicerola čija sinteza je, inače, u ovom periodu najveća. Tkiva se na ovaj način oslobađaju viška OA vode, štite se glicerolom od niskih temperatura i

dehidracije, a gubitak vode iz hemolimfe se sprečava izuzetno visokom koncentracijom glicerola koji višak OA vode vezuje i prevodi u OI frakciju.

U prilog ovome govore i rezultati koji su dobijeni u jednostavnom eksperimentu sa dodatkom glicerola u hemolimfu nedijapauzirajućih larvi plamenca, koje ga inače ne sadrže u visokim koncentracijama. Pomoću DSC analize određen je sadržaj OA i OI vode u hemolimfi i utvrđeno je da se sa povećanjem količine glicerola koji se dodaje u hemolimfu smanjuje količina OA, a povećava količina OI frakcije. Dalje, uočeno je da upravo one količine dodatog glicerola (~0,2 mg/mg ukupne vode) koje odgovaraju njegovom fiziološkom opsegu u dijapauzi (0,7–0,5 mmol/L), smanjuju količinu OA čime se postiže da se odnos OA:OI kreće u rasponu od 0 do 2, upravo onako kako je utvrđeno i kod ostalih tkiva u dijapauzi. Ovaj eksperiment nedvosmisleno ukazuje da glicerol u hemolimfi *O. nubilalis*, sem antifriz efekata, ima i antidehidrataciono zaštitno svojstvo.

Na kraju dijapauze u svim tkivima dolazi do smanjenja ukupne, OA i OI vode, najverovatnije usled dugotrajnog gladovanja i bez unošenja vode, ali i smanjenog intenziteta procesa iz kojih se dobijala određena količina metaboličke vode (glikogenoliza). Naime, ranija istraživanja su pokazala da koncentracija glicerola raste od septembra, dostiže maksimum u januaru, a potom polako opada (Grubor-Lajšić 1983). Razlog za to je što se glicerol zajedno sa drugim zaštitnim metabolitima ponovo prevodi u glikogen (Storey i Storey, 1988), kako je to i pokazano kod *O. nubilalis* (Grubor-Lajšić i dr., 1991). Takođe, na osnovu rezultata može se pretpostaviti da se tokom dijapauze paralelno odvijaju sledeći procesi – nekontrolisana, pasivna dehidracija i kontrolisano menjanje režima vode kao posledica metaboličkih promena (razgradnja glikogena i lipida, sinteza poliola i drugih osmotski aktivnih metabolita i dr.), koje vode prilagođavanju niskim temperaturama.



### 5.1.3 Adenin nukleotidi i energetska naboj

Poznato je da kod mnogih organizama koji ulaze u dijapauzu dolazi do smanjenja aktivnosti mitohondrijskih enzima kao što su citrat sintaza, NAD-izocitrat dehidrogenaza, glutamat dehidrogenaza, citohrom *c* oksidaza (Joanisse i Storey, 1994). Smanjenje intenziteta metabolizma u dijapauzi je karakteristično i za larve *O. nubilalis*, koje u fazi mirovanja troše kiseonik do četiri puta manje nego tokom aktivnog razvoja (Beck i Hanec, 1960).

Energetski status larvi *O. nubilalis* u ovom istraživanju praćen je merenjem koncentracije adenin nukleotida (ATP, ADP i AMP), upoređivanjem njihovog odnosa (energetski naboj), određivanjem aktivnosti citohrom *c* oksidaze (COX), kao i merenjem koncentracije NAD<sup>+</sup> i NADP<sup>+</sup> koenzima i ekspresije gena koji kodiraju pojedine subjedinice kompleksa respiratornog lanca.

Energetski naboj opada kod dijapauzirajućih gusenica, što je posledica pada koncentracije ATP-a i porasta koncentracije AMP-a. AMP ima najvišu koncentraciju početkom dijapauze, u dijapauzirajućoj grupi 2 meseca na 5°C, nakon čega blago opada tokom dijapauze. Odnosi ADP/ATP i AMP/ATP su veći u dijapauzirajućim grupama, u poređenju sa nedijapauzirajućim. Sa druge strane, nizak nivo ATP-a i ADP-a, a visok nivo AMP-a je karakterističan i za dijapauzirajuće larve na visokoj temperaturi. Ovakvi rezultati ukazuju na endogenu regulciju potrošnje energetske ekvivalenata u dijapauzi, što odnosi ADP/ATP i AMP/ATP između D2 i D2t grupa i potvrđuju.

ATP predstavlja univerzalnu energetska „monetu“ u živim sistemima, jer se njegovom hidrolizom oslobađa velika količina energije, koja omogućava odigravanje velikog broja biohemijskih reakcija. Stoga, da bi očuvale homeostazu, ćelije moraju održavati visok odnos ADP/ATP i AMP/ATP nukleotida. Naročito je važan odnos AMP/ATP nukleotida, jer je poznato da su ovi adenin nukleotidi važni alosterni modulatori enzima, ali najčešće sa suprotnim efektima (Hardie i Hawley, 2001). Zbog toga, u ćelijama postoje sofisticirani mehanizmi za praćenje energetske stanja, a jedan od njih je i enzim AMPK.

Promena koncentracije adenin nukleotida tokom dijapauze larvi *O. nubilalis* su u skladu sa rezultatima dobijenim u sličnoj studiji mirovanja ribe *Astrofundulus limnaeus* (Podrabsky i Hand, 1999). Rezultati studije pokazali su da ATP-a i ADP-a ima više tokom razvoja, dok njihova koncentracija u dijapauzi opada. Sa druge strane, AMP raste na početku dijapauze i potom se održava na visokom nivou konstantno. Takođe, odnos ATP/ADP i energetski naboj opadaju tokom mirovanja ribe *A. limnaeus*. Slično, i u studiji na embrionima račića *A. franciscana*, utvrđeno je da je koncentracija AMP-a izuzetno visoka u dijapauzi, dok je koncentracija ATP-a i ADP-a u granicama detekcije (Zhu i dr., 2009).

Održavanje odnosa adenozin-fosfata je naročito važno kod organizama koji su adaptirani na preživljavanje hipoksije i anoksije, kao što su brojne vrste slatkovodnih kičmenjaka. Poznato je da hipoksija ili anoksija u ćelijama kičmenjaka vrlo brzo izaziva pad koncentracije ATP-a, a potom i pojavu apoptoze ili nekroze. Iz tog razloga, preživljavanje dugog perioda bez kiseonika mora uključivati pažljivu kontrolu procesa proizvodnje i potrošnje ATP-a. Kako se tokom dijapauze i izlaganja niskim temperaturama kod larvi kukuruznog plamenca smanjuje potrošnja kiseonika (McLeod i Beck, 1963) i broj mitohondrija (Jovanović-Galović, 1997), moglo bi se reći da se ćelije larvi susreću sa dugotrajnom fiziološkom hipoksijom.

Mehanizmi adaptacije na nedostatak kiseonika mogu se grubo podeliti u dve faze – fazu odbrane i fazu spasavanja. Faza odbrane, koja podrazumeva akutni odgovor ćelije na hipoksiju, odlikuje se redukcijom energetski skupih procesa kao npr. rad jonskih pumpi i sinteza proteina (Hochachka i Lutz, 2001). Za razliku od faze odbrane, faza spasavanja ima za cilj da omogući dugoročno preživljavanje ćelije i uključuje konstantno praćenje koncentracije kiseonika kao i aktiviranje puteva ćelijskog signalinga koji vode do modulacije opšteg metabolizma i ekspresije gena (Semenza, 1999; Scott i dr., 2002; Ramaglia i Buck, 2004).

Jedan od faktora koji bi mogao biti uključen u ćelijski signaling tokom mirovanja je i visoka koncentracija AMP-a koji, preko aktivacije kinaze AMPK, može uticati na različite ćelijske procese. Poznato je da jednom aktivirana AMPK fosforiliše brojne

citosolne proteine/enzime (Zhu i dr., 2009), što za posledicu ima kako smanjenje intenziteta biohemijskih procesa koji troše energiju, tako i zaustavljanje ćelijske deobe preko p27 i p53 regulatornih proteina (Hardie i Hawley, 2001; Nicoptera i Melino, 2004; Hardie 2007). AMPK fosforiliše acetyl-CoA karboksilazu i glikogen sintazu čime ih inhibira, što za posledicu ima supresiju lipogeneze i glikogeneze, ali i stimulaciju njihovog katabolizma (Rider i dr., 2000). Aktivnost AMPK ipak ne mora biti značajna samo tokom mirovanja, već i u nastavku razvoja nakon dijapauze, kako je to dokazano kod embriona račića *A. franciscana* (Zhu i dr., 2009).

Osim AMP nukleotida, važan signalni molekul u adaptaciji na hipoksiju i gladovanje može biti i adenzin, čija se koncentracija značajno povećava smanjenjem dostupnosti kiseonika (Lutz i Kabler, 1997; Eltzhig, 2003). Adenzin prevashodno nastaje kao krajnji produkt hidrolize ATP-a, u reakciji defosforilacije AMP-a. Iz tog razloga, povećanje koncentracije adenozina može biti jak signal da je ćelija u energetske nepovoljnom statusu i da mora da adaptira svoj metabolizam na novonastale uslove. Osim unutarćelijskog dejstva, adenzin koji nastaje izvan ćelije prenosi se putem telesnih tečnosti i preko svojih receptora ispoljava različite metaboličke i fiziološke efekte kao što su – proširenje krvnih sudova, stimulacija glikogenolize, stimulacija anaerobne glikolize, smanjenje nadražljivosti nerava, otpuštanje neurotransmitera, modulacija imunog odgovora (Eltzhig, 2003). Kod slatkovodne kornjače *Trachemys scripta* utvrđeno je da se tokom dugotrajne anoksije u mozgu oslobađa ATP, a potom od njega formira vanćelijski adenzin koji pomaže organizmu da se adaptira na preživljavanje bez kiseonika (Lutz i Kabler, 1997), povećavajući anaerobnu glikolizu (Lutz i Nilsson, 1997) i smanjujući aktivnost jonskih pumpi i propustljivost jonskih kanala (Buck, 2004). U normometabolizmu se adenzin pomoću adenzin kinaze brzo konvertuje u AMP, dok se u uslovima hipoksije i anoksije to ne događa zbog inhibicije ovog enzima (Buck, 2004).

Dobijeni rezultati povećane koncentracije AMP-a početkom dijapauze u larvama kukuruznog plamenca gajenih na nižoj temperaturi mogli bi biti u vezi sa adaptacijom metabolizma kako na mirovanje, tako i na niske temperature. Naime,

u ranijim studijama dijapauze *O. nubilalis* utvrđeno je da se razgradnja glikogena intenzivira početkom i sredinom dijapauze, radi sinteze glicerola, metabolita važnog za otpornost na niske temperature (Grubor-Lajšić i dr., 1991). Intenzivna glikogenoliza i depresija metabolizma mogle bi biti posledice delovanja AMP-a preko AMPK, čija aktivacija bi doprinela ne samo zaustavljanju lipogeneze u masnom telu, nego i otpočinjanju lipolize kao važnom izvoru energije tokom dugotrajnog mirovanja kod insekata (Hahn i Denlinger, 2007, 2011). Kod *O. nubilalis* sredinom dijapauze se smanjuje ukupna količina lipida, što potvrđuje intenzivnu lipolizu u početnim mesecima dijapauze (Grubor-Lajšić, 1983).

#### 5.1.4 Nikotin-adenin dinukleotidi (NAD<sup>+</sup> i NADP<sup>+</sup>)

Koncentracije NAD<sup>+</sup> i NADP<sup>+</sup> koenzima su izmerene kapilarnom elektroforezom i rezultati su pokazali da se koncentracije ovih koenzima na suprotan način menjaju tokom razvoja larvi. Naime, koncentracija NAD<sup>+</sup> je najviša u nedijapauzirajućim grupama (ND i PD), a u dijapauzirajućim je niska početkom i sredinom i blago raste pred kraj dijapauze. Za razliku od NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup> koenzim ima najnižu koncentraciju u nedijapauzirajućim larvama, a njegova koncentracija se značajno povećava u predijapauzirajućoj, ali i u većini dijapauzirajućih grupa. Koncentracija NADP<sup>+</sup> je visoka u prvim mesecima dijapauze, a potom postepeno opada tokom njenog trajanja.

Visoka koncentracija NAD<sup>+</sup> koenzima je očekivano smanjena kod dijapauzirajućih larvi kod kojih je metabolizam suprimiran u odnosu na nedijapauzirajuće larve sa intenzivnom respiracijom i metabolizmom. Kako su NADH/NAD<sup>+</sup> glavni prenosnici redukovanih ekvivalenata do elektron-transportnog lanca u mitohondrijama, sniženje koncentracije NAD<sup>+</sup> u dijapauzi je bilo očekivano s obzirom na to da se larve tokom mirovanja ne hrane, a stopa metabolizma se snižava kao i potrošnja kiseonika. Pad NAD<sup>+</sup> se uočava već u predijapauzirajućoj grupi koja je svega nekoliko dana u gladovanju, dok se istovremeno uočava nagli porast NADP<sup>+</sup> koenzima, što može biti signal pripreme za ulazak u dijapauzu i izmene u metabolizmu.

Sa druge strane, visoka koncentracija NADP<sup>+</sup> koenzima u početnim mesecima dijapauze je u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima dijapauze kukuruznog plamenca (Stanić i dr., 2004). Autori ove studije su pokazali da postoji tesna veza između sinteze glicerola, aktivnosti heksozo-monofosfatnog šanta i sistema antioksidativne zaštite. Utvrđeno je da se u početnim mesecima dijapauze povećava aktivnost heksozo-monofosfatnog šanta i sinteza NADPH. Tokom dijapauze, NADPH služi kao izvor redukcionih ekvivalenata u antioksidativnoj zaštiti, predstavljajući supstrat za regeneraciju antioksidativnih molekula kao što su GSH, tioredoksin, glutaredoksin i drugi. Takođe, NADPH je neophodan za biosintetske procese, između ostalih i za proizvodnju glicerola koji učestvuje u zaštiti ćelija od niskih temperatura (Stanić i dr., 2004; Blagojević, 2007). Zanimljivo je da je ovoj disertaciji u istim grupama (D2 i D4), osim povećanja koncentracije NADP<sup>+</sup> koenzima, utvrđeno i značajno povećanje transkripcije gena za tioredoksin.

### **5.1.5 Aktivnost citohrom c oksidaze**

Kao dodatni marker energetskog stanja larvi kukuruznog plamenca merena je i aktivnost citohrom c oksidaze.

Citohrom c oksidaza (COX) je ključna komponenta elektron-transportnog lanca i posredno oksidativne fosforilacije u mitohondrijama, a samim tim je veoma važan marker procesa proizvodnje ATP-a. Izmerena aktivnost COX je bila viša u larvama koje su bile na višoj temperaturi (ND, PD i D2t) u odnosu na dijapauzirajuće larve na nižoj temperaturi, kod kojih je sredinom dijapauze detektovana i najniža aktivnost. Niža aktivnost COX u dijapauzi na niskim temperaturama ukazuje na metaboličku depresiju i u skladu je sa ranije utvrđenim smanjenjem broja mitohondrija (Jovanović-Galović, 1997). Takođe, ovakvi rezultati sugerišu da je smanjena aktivnost COX u D2, D4 i D6 grupama adaptacija za preživljavanje niskih temperatura. Sa druge strane, visoka aktivnost COX u PD grupi upućuje na to da je intenzivan oksidativni metabolizam neophodan za obezbeđivanje energetske ekvivalenata za sve kataboličke i anaboličke procese koji učestvuju u pripremi za dijapauzu. Ipak, istovremeni pad nivoa ATP-a u ovoj grupi ukazuje na njegovu intenzivnu potrošnju u pripremnom periodu.

Slični rezultati, sa nižom aktivnošću COX kod dijapauzirajućih u odnosu na nedijapauzirajuće grupe, dobijeni su i kod pamučnog moljca *H. armigera* (Yang i dr., 2010), račića *A. franciscana* (Reynolds i Hand, 2004), moljca *Omphisa fuscidentalis* (Singtripop i dr., 2007), kao i kod vrste moljca *Epiblema scudderiana* i muve *Eurosta solidaginis* (McMullen i Storey, 2008). Kod moljca *E. scudderiana* i muve *E. solidaginis* utvrđeno je da aktivnost COX dodatno opada sa izlaganjem dijapauzirajućih jedinki niskim temperaturama (McMullen i Storey, 2008), što je u skladu i sa rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji koji sugerišu da izlaganje niskim temperaturama značajno doprinosi modulaciji i supresiji metabolizma tokom dijapauze. Takođe, u dijapauzirajućim lutkama *Agrius convolvuli* aktivnost citohrom *c* oksidaze je povećana krajem dijapauze (Uno i dr., 2004), što je u skladu sa rezultatima dobijenim kod *O. nubilalis*.

### **5.1.6 Ekspresija gena kompleksa elektron-transportnog lanca i ATP sintaze**

Pored određivanja koncentracije adenin nukleotida, nikotin adenin dinukleotidnih koenzima i aktivnosti COX, praćena je ekspresija određenih gena u vezi sa biogenezom i energetske metabolizmom mitohondrija. Urađena je Q-PCR analiza transkripata za pojedine subjedinice za NADH dehidrogenazu, KoQ-citohrom *c* oksidoreduktazu, citohrom *c* oksidazu, ATP sintazu, kao i za ATP/ADP translokazu i prohibitin 2.

Za većinu analiziranih gena respiratornog lanca, osim za KoQ-citohrom *c* oksidoreduktazu, utvrđen je sličan obrazac relativne ekspresije – između nedijapauzirajućih i predijapauzirajućih larvi nije uočena velika razlika, dok je ekspresija kod larvi 2 meseca u dijapauzi na visokoj temperaturi (D2t) veća u odnosu na larve iste starosti, ali na nižoj temperaturi (D2). Najniža ekspresija svih analiziranih gena je u prva dva meseca dijapauze (D2), a broj transkripata se postepeno povećava tokom dijapauze dostižući maksimum nakon šest meseci (D6).

Sličan nivo ekspresije između grupa PD i D2t (osim za KoQ-citohrom *c* oksidoreduktazu) najverovatnije je posledica razvoja larvi u sličnim temperaturnim uslovima ( $22\pm 1^\circ\text{C}$ ), na kojima su energetske potrebe i intenzitet metabolizma i dalje na visokom nivou bez obzira na to što su predijapauzirajuće larve, usled kraćeg fotoperioda, predodređene za ulazak u dijapauzu. Ovakvi rezultati genske ekspresije su u skladu sa ekspresijom *Cox* gena u dijapauzi moljca *H. armigera* (Yang i dr., 2010), ali i sa rezultatima u ovoj tezi. Sa druge strane, ekspresija KoQ-citohrom *c* oksidoreduktaze se razlikuje od ostalih gena respiratornog lanca, jer je u PD grupi došlo do značajnog povećanja broja transkripata u odnosu na ostale grupe, što može predstavljati svojevrsan odgovor ćelija na intenzivnu potrošnju ATP-a i njegovu povećanu produkciju u pripremnom periodu dijapauze, o čemu govori i visoka aktivnost COX.

Za larve koje su u dijapauzi na  $5^\circ\text{C}$  (grupe D2, D4, D6) obrazac ekspresije svih analiziranih gena respiratornog lanca je karakterističan. Zajedničko za sve gene je da je ekspresija najmanja u D2 grupi i da tokom dijapauze postepeno raste, ali se nivoi ekspresije značajno razlikuju među analiziranim genima. Sličan obrazac imaju NADH dehidrogenaza i ATP sintaza, kod kojih je ekspresija početkom dijapauze suprimirana, a potom raste dostižući nivo ekspresije ovih gena kod nedijapauzirajućih larvi. Sa druge strane, ekspresija KoQ-citohrom *c* oksidoreduktaze i citohrom *c* oksidaze je blago suprimirana na početku dijapauze (D2), a potom raste i dostiže nekoliko puta viši nivo u odnosu na nedijapauzirajuće gusenice.

Kako je poznato da je respiracija kod dijapauzirajućih jedinki na niskoj temperaturi daleko niža nego kod nedijapauzirajućih (Wipking i dr., 1995), verovatno je da niske temperature utiču na smanjenje ekspresije ispitivanih gena za komplekse respiratornog lanca, sintezu ATP-a i biogenezu mitohondrija. U prilog tome govori smanjena aktivnost COX u larvama koje su u dijapauzi na  $5^\circ\text{C}$ .

Iako nisu brojne, analize ekspresije gena respiratornog lanca opisane su i kod drugih dijapauzirajućih vrsta, mada nisu istovremeno analizirani geni svih enzimskih kompleksa. Ekspresija *Cox* gena se, u odnosu na ND grupu, ne menja

tokom dijapauze *Eurosta scudderiana*, mada se može uočiti niža ekspresija sredinom dijapauze koja nije statistički značajna (McMullen i Storey, 2008). U larvalnoj dijapauzi moljca *H. armigera* ekspresija *Cox* je niža u odnosu na nedijapauzirajuću grupu (Yang i dr., 2010), a u masnom telu vatrene stenice *Pyrrhocoris apterus* pokazano je postepeno smanjenje broja transkripata za *Cox* tokom 120 dana reproduktivne dijapauze (Košťál i dr., 2008).

U larvalnoj dijapauzi moljca *Omphisa fuscidentalis* je pokazano da tretman analogom juvenilnog hormona dovodi do izlaska iz dijapauze, nakon čega dolazi do povećanja ekspresije *Cox1* gena, veće aktivnosti COX enzima i povećane potrošnje kiseonika (Singtripop i dr., 2007).

Sa druge strane, kod nekih organizama je utvrđeno da se u dijapauzi i nakon izlaganja niskim temperaturama povećava ekspresija pojedinih gena za subjedinice kompleksa respiratornog lanca i oksidativne fosforilacije. Kod moljca *H. armigera* ekspresija ATP sintaze je povećana tokom inicijacije dijapauze (Bao i Xu, 2011), dok je kod severnog kućnog komarca *Culex pipiens* L. ekspresija *Cox1* povećana samo u ranoj, a *Cox3* i tokom cele adultne dijapauze (Robich i dr., 2007). Kod šumske žabe *Rana sylvatica*, koja preživljava zamrzavanje, dolazi do povećanja ekspresije gena za NADH dehidrogenazu u periodima izloženosti niskim temperaturama (Storey, 2004), a kod kornjače *Trachemys scripta elegans*, koja prezimljuje u hipoksičnim hladnim vodama, dolazi do povećanja ekspresije *Cox1* i *nad5* tokom anoksije (Storey, 2007). Slično transkriptomskim analizama, i proteomske studije pokazale su da niska temperatura povećava ekspresiju gena za ATP sintazu kod parazitske ose *Aphidius colemani* (Colinet i dr., 2007) i kod šarana *Cyprinus carpio* (Kikuchi i dr., 1999), s tim što je kod šarana u kasnijoj studiji utvrđeno i povećanje transkripata za ATP sintazu (Itoi i dr., 2003).

Povećana ekspresija gena elektron-transportnog lanca na niskim temperaturama verovatno predstavlja odgovor organizma na hipoksiju i vid adaptacije na smanjenu aktivnost enzima respiratornog lanca u cilju boljeg korišćenja dostupnog kiseonika (Itoi i dr., 2003; Storey, 2004; Storey, 2007). Razlozi neslaganja smanjene ekspresije ispitivanih gena u dijapauzi *O. nubilalis*, dobijene u ovoj tezi,



sa navedenim primerima povećane ekspresije istih gena kod drugih organizama mogu biti brojni. Prvo, ekspresija gena ne mora biti u korelaciji sa ekspresijom proteina i aktivnošću enzima. Drugo, filogenetska udaljenost navedenih model organizama je velika, jer je povećana ekspresija mitohondrijskih gena većinom utvrđena u dormanciji kičmenjaka. Dalje, kako su kičmenjaci kompleksniji organizmi od insekata i imaju kompleksniji cirkulatorni i respiratorni sistem, njihova tkiva, a pre svih nervno, imaju veće potrebe za kiseonikom i osetljivija su na nedostatak kiseonika od beskičmenjačkih. Iz tog razloga, tokom hipoksije i smanjene aktivnosti ključnih enzima respiratornog lanca, kompenzacija smanjenog priliva kiseonika u tkivima kičmenjaka se verovatno postiže povećanjem broja transkripata i enzima respiratornog lanca u mitohondrijama, a samim tim i povećanjem iskoristljivosti dostupnog kiseonika. Kod *O. nubilalis* se dešava upravo suprotno – broj mitohondrija se smanjuje tokom dijapauze (Jovanović-Galović, 1997).

### **5.1.7 Ekspresija gena za ATP/ADP translokazu i prohibitin 2**

Osim respiratornog lanca, važnu ulogu u održavanju energetske statusa ćelija i normalnom funkcionisanju mitohondrija imaju i drugi proteini. ATP/ADP translokaze se nalaze na unutrašnjoj membrani mitohondrija i transportuju ATP u citoplazmu, a ADP u mitohondrije. Ekspresija ovog gena značajno je povećana kod D2t i D6 larvi i ima sličan obrazac ekspresije sa citohrom *c* oksidoreduktazom, citohrom *c* oksidazom i ATP sintazom. Takođe, karakteristično je da je utvrđeno smanjenje ekspresije *ANT* gena u ranoj dijapauzi na niskoj temperaturi (D2 grupa), u poređenju sa grupama u dijapauzi na visokoj temperaturi (PD i D2t).

Imajući u vidu da je kod predijapauzirajućih (PD) i dijapauzirajućih gusenica na višoj temperaturi (D2t) povećana ekspresija gena za ATP/ADP translokazu, visoka aktivnost COX i smanjena koncentracija ATP-a, možemo pretpostaviti da se metabolizam larvi, iako su one u pripremi za mirovanje ili već u mirovanju, zadržao na visokom nivou. Kako se u dijapauzi larve kukuruznog plamenca ne hrane, ATP se sintetiše u manjoj količini, a intenzivno troši (pad koncentracije), to se njegov nedostatak u citoplazmi verovatno nadomešćuje povećanom

transkripcijom gena za ATP/ADP transporter i sintezom novih molekula transportera koji omogućuju brži i veći promet ovih nukleotida. Osim toga, i kod ovog gena prisutan je obrazac povećanja ekspresije tokom dijapauze, što ukazuje na pripremanje za intenzivni metabolizam posle izlaska iz dijapauze, nastavak životnih aktivnosti i preobražaj. Kod šumske žabe *R. sylvatica* dolazi do povećanja ekspresije gena za ATP/ADP translokazu u zimskim periodima (Storey, 2004), što je u suprotnosti sa rezultatima u ovoj disertaciji, najverovatnije zbog filogenetske udaljenosti i morfo-fizioloških razlika između eksperimentalnih organizama i različitih vrsta mirovanja.

Na unutrašnjoj membrani mitohondrija nalazi se i heterokompleks prohibitina 1 i 2, koji učestvuje u njihovoj biogenezi, pravilnom uspostavljanju proteina kompleksa respiratornog lanca i zaštiti od oksidativnog stresa (Merkwirth i dr., 2008). Ekspresija gena za prohibitin 2 (*Phb2*) ima sličan obrazac kao ekspresija ATP/ADP translokaze, s tim što je povećanje ekspresije *Phb2* u PD i D2t grupi manje izraženo, a supresija početkom dijapauze na niskoj temperaturi (D2) je veća. Intenzivnija ekspresija *Phb2* u grupama na sobnoj temperaturi je u skladu sa pretpostavljenom visokom metaboličkom aktivnošću ovih larvi. Sa druge strane, kako prohibitin učestvuje u biogenezi mitohondrija i pravilnom formiranju respiratornog lanca (Coates i dr., 1997), supresija ekspresije *Phb2* kompleksa početkom dijapauze na niskim temperaturama može biti posledica aktivnog smanjivanja broja mitohondrija u larvama *O. nubilalis*, što je čest mehanizam adaptacije insekata na niske temperature (McMullen i Storey, 2008).

Takođe, supresija može biti odraz adaptacije na stanje mirovanja i način produžetka života tokom gladovanja, kako je to opisano u dijapauzi valjkastog crva *C. elegans* (Artal-Sanz i Tavernakis, 2009). Naime, autori smatraju da prohibitin promoviše dugovečnost modulišući korišćenje lipida i proizvodnju energije preko respiratornog lanca mitohondrija. Ipak, pri uslovima koji favorizuju dijapauzu, kao što su dostupnost nutrijenata, ćelije se adaptiraju usmeravajući svoj metabolizam na anaerobne procese i u takvim uslovima, kada potreba za energijom premašuje kapacitete mitohondrijske respiracije, nedostatak prohibitina je presudan za preživljavanje. Autori su to dokazali koristeći RNK interferenciju za utišavanje

ekspresije *Phb1* i *Phb2* kod divljeg tipa i mutanata nematode *C. elegans*. Smanjenje ekspresije *Phb1/2* skraćuje život divljeg tipa životinja, ali istovremeno produžava život jedinkama koje su na kalorijskoj restrikciji, kao i mutantima koji ne mogu da uđu u dijapauzu tzv. Dauer stanje (Artal-Sanz i Tavernakis, 2009).

Nalazi opisane studije kod *C. elegans* su u skladu sa rezultatima dobijenim u ovoj tezi, koji su pokazali da je ekspresija PHB-2 smanjena početkom dijapauze na nižim temperaturama, verovatno kao vid adaptacije za preživljavanje tokom mirovanja. Takođe, kod većine organizama poznato je da je metabolička depresija najdublja u prvoj polovini trajanja dijapauze, da supresija vremenom slabi i da se intenzitet aerobnog metabolizma ponovo povećava pred izlazak iz dijapauze. Iz tog razloga, tokom drugog dela dijapauze organizam se polako priprema za izlazak iz hipometabolizma intenziviranjem procesa biogeneze mitohondrija, u kojoj prohibitin ima važnu ulogu (Coates i dr., 1997), na šta ukazuju i rezultati Q-PCR analize u ovoj disertaciji. U prilog tome svedoči i povećanje ekspresije gena čiji su produkti uključeni u glikolizu i sintezu ATP-a.

Dobijeni rezultati relativne ekspresije gena ukazuju na to da je transkripcija usaglašena sa energetske potrebama larvi kukuruznog plamenca, kao i da temperatura ima uticaja na modulaciju transkripcije gena u vezi sa metabolizmom mitohondrija. Niža temperatura ima drugačije efekte u različitim periodima dijapauze – početkom dijapauze dovodi do supresije, a kasnije do povećanja ekspresije svih analiziranih gena. Sa druge strane, na višoj temperaturi, kada su metabolički procesi visoko aktivni, ekspresija gena je ili nepromenjena ili još češće povećana, bilo da su larve pred ulaskom u dijapauzu ili već u dijapauzi. Takođe, postepeni porast broja transkripata svih gena, a moguće i njihova akumulacija tokom dijapauze, mogu biti vid pripreme organizma za izlazak iz dijapauze i za metamorfozu. Nakon izlaska iz dugog perioda mirovanja, tokom kojeg je metabolizam bio usporen, za brz nastavak razvoja neophodna je biogeneza mitohondrija i reaktivacija oksidativnog metabolizma, a brojni transkripti gena u vezi sa energetske metabolizmom mitohondrija služe kao dobar izvor za sintezu proteina.

### 5.1.8 UPM i GMP

Pored adenin nukleotida i koenzima NAD<sup>+</sup> i NADP<sup>+</sup>, kapilarnom elektroforezom detektovani su i UMP i GMP nukleotidi. Kapilarna elektroforeza je pokazala da se koncentracija oba nukleotida značajno razlikuje među eksperimentalnim grupama.

GMP ima najvišu koncentraciju kod ND larvi i pred kraj dijapauze u grupi D6, dok je kod predijapauzirajućih larvi koncentracija izuzetno niska. S obzirom na oskudnost literaturnih podataka o učešću GMP-a u dijapauzi, dobijeni rezultati bi se mogli objasniti pretpostavljajući moguće funkcije fiziološki važne forme GMP nukleotida – cikličnog GMP-a (cGMP), koji se korišćenom tehnikom kapilarne elektroforeze u ovoj tezi, na žalost, nije mogao zasebno kvantifikovati (odvojeno od neciklične forme). Na osnovu literaturnih podataka možemo pretpostaviti da on kod nedijapauzirajućih larvi verovatno učestvuje kao sekundarni glasnik u različitim procesima, pa i u metamorfozi. Naime, poznato je da cGMP povećava sintezu ekdizona kod moljca duvana *Manduca sexta*, preko povećane aktivnosti ekdizon 20-monooksigenaze (Drummond i dr., 2010). Takođe, cGMP može uticati, preko cGMP-zavisne protein kinaze (PKG), i na obrasce ishrane kod insekata kako je to i pokazano kod *Apis mellifera*, *D. melanogaster* i *C. elegans* (Hahn i Delinger, 2007). S obzirom na to da je kod *O. nubilalis* utvrđena smanjena koncentracija GMP-a kod predijapauzirajućih larvi koje su nedavno prestale da se hrane, moguće je da je prestanak ishrane regulisan niskom koncentracijom cGMP-a i smanjenom aktivnošću PKG.

Takođe, povećanje GMP-a pred kraj dijapauze kukuruznog plamenca može biti u vezi sa pripremanjem organizma za izlazak iz mirovanja i nastavak aktivnog razvoja, kao što je to pokazano kod drugih insekata. Naime, kod muve *S. crassipalpis* je pokazano da se dijapauza prekida kada se cGMP ili njegovi derivati injektiraju u dijapauzirajuće lutke (Fujiwara i Denlinger, 2007), a kod moljca, *Mamestra configurata*, je utvrđeno da cAMP učestvuje u održavanju dijapauze, dok cGMP dovodi do njene terminacije (Bodnaryk, 1987). Kod valjkastog crva *C. elegans* je utvrđeno da cGMP, insulin i TGF- $\beta$  (*engl.* transforming growth factor beta) regulišu

ishranu i na osnovu dostupnosti nutrijenata utiču na ulazak u stanje mirovanja (Dauer), omogućujući organizmu da preživi nepovoljne uslove (You i dr., 2008).

Kada je u pitanju UMP nukleoti, kapilarna elektroforeza je pokazala da njegove koncentracije relativno niske u svim eksperimentalnim grupama, sem u larvama koje su u dijapauzi dva i četiri meseca na niskoj temperaturi (D4 i D6). Koncentracija UMP nukleotida u tim grupama bila je desetostruko povećana, da bi se na kraju dijapauze opet vratila na predijapauzirajući nivo. U literaturnim izvorima ne postoje podaci o značaju UMP nukleotida u razvoju insekata, niti u fazama mirovanja, što otežava tumačenje rezultata. Iz tog razloga, UMP možemo posmatrati ili kao prekursor za sintezu UDP nukleotida ili obrnuto, kao produkt hidrolize UDP-a u reakciji fosforilacije ADP-a i regeneracije ATP-a.

UDP nukleotidi (UDP-glukoza) učestvuju u procesima sinteze trehaloze i glikogena. U larvama *O. nubilalis* sinteza glikogena je intenzivna pred ulazak u dijapauzu, nakon čega se on kataboliše služeći kao izvor glukoze koja je neophodna za dobijanje energije, ali i za sintezu glicerola tokom dijapauze (Grubor-Lajšić i dr., 1991). Osim glicerola, i trehaloza se intenzivno sintetiše u početnim mesecima dijapauze kao važna komponenta razvoja otpornosti na niske temperature kukuruznog plamenca (Kojić i dr., 2010). S tim u vezi, povećana koncentracija UMP-a u početnim mesecima dijapauze kukuruznog plamenca je verovatno u korelaciji kako sa procesima razgradnje glikogena, tako i sinteze glicerola, trehaloze i ATP-a.

## 5.2 Relativna ekspresija gena u vezi sa odgovorom na stres

Ćelijski odgovor na stres sličan je kod svih organizama, od najjednostavnijih prokariota do sisara. On se odlikuje povećanom sintezom zaštitnih molekula, među kojima su najbrojniji proteini koji imaju važnu i nezamenljivu ulogu, jer učestvuju u brojnim procesima – zaštiti i popravci DNK, degradaciji ili popravci oštećenih proteina, regulisanju redoks stanja, zaštiti ćelijske membrane ili drugih supramolekulskih struktura, regulaciji metabolizma, ćelijskog ciklusa i ćelijske smrti (Kültz, 2005). Do sada je opisan veliki broj proteina stresa i uočeno je da postoji oko 300 evolutivno očuvanih proteina okarakterisanih kao najmanji zajednički proteom stresa, među kojima su brojni antioksidativni enzimi i proteini toplotnog stresa (Koonin, 2000; Kültz, 2003).

Dijapauza, kao strategija preživljavanja u stanju hipometabolizma, predstavlja period tokom kojeg se organizmi neminovno suočavaju sa brojnim stresnim faktorima, kako spoljašnjim tako i unutrašnjim (Košťál, 2006). U ovoj disertaciji je, na osnovu rezultata Q-PCR analize iRNK iz masnog tela larvi *O. nubilalis*, određena relativna ekspresija različitih gena čiji produkti učestvuju u odgovoru na stres.

### 5.2.1 Ekspresija gena antioksidativne zaštite

#### *Ekspresija GST*

Relativna ekspresija gena za glutation *S*-transferazu (*GST*) je smanjena u svim grupama, sem na kraju dijapauze (D6). Rezultati ekspresije *GST* gena u skladu su sa njenom aktivnošću, za koju je utvrđeno da je dva puta niža kod dijapauzirajućih u odnosu na nedijapauzirajuće larve, kao i da je slična početkom i sredinom, a da opada krajem dijapauze (Jovanović-Galović i dr., 2004; Jovanović-Galović i dr., 2007). Povećana ekspresija *GST* gena na kraju dijapauze može biti ili odgovor na smanjenu enzimsku aktivnost *GST* ili vid pripreme organizma za izlazak iz dijapauze, s obzirom na to da *GST*, osim u antioksidativnoj zaštiti, učestvuje i u detoksikaciji alelometabolita unetih hranom (Frova, 2006).

Na primer, kod insekta iz reda tvrdokrilaca *Agrilus planipennis*, čija larva se ubušuje u različite vrste jasena, praćena je genska ekspresija 6 različitih klasa GST enzima i utvrđeno je da se one drugačije ekspresuju kako u različitim tkivima, tako i tokom razvoja. Ipak, na osnovu aktivnosti GST koja je slična među svim tkivima, pretpostavljeno je da među klasama GST postoji jasna podela na one GST koje su uključene u procese detoksikacije alelohemikalija iz hrane i one koje su uključene u antioksidativnu zaštitu (Rajarapu i Mittapalli, 2013).

Literaturni podaci o ekspresiji *GST* u različitim fazama mirovanja ili nakon izlaganja niskim temperaturama su dvojaki – kod nekih organizama ekspresija je povećana, dok je kod drugih ili promenljiva ili smanjena (Carrasco i dr., 2011). Ekspresija *GST* praćena je kod moljca *Choristoneura fumiferana* i utvrđeno je da ona varira tokom različitih larvalnih stupnjeva, ali da se ne povećava nakon izlaganja niskim temperaturama (Feng i dr., 2001), što je u skladu sa rezultatima u ovoj disertaciji. Slično, ekspresija gena različitih klasa GST se razlikovala među tkivima morskog puža *Littorina littorea* koji je otporan na anoksiju (Strorey i dr., 2013). Ekspresija *GST* može biti u vezi sa povećanom otpornošću na gubitak vode, kao što je to pokazano u krioprotektivnoj dehidraciji arktičke kolebole *M. arctica* i anhidrobiozi tardigrade *Milnesium tardigradum* (Clark i dr., 2009; Mali i dr., 2010).

#### *Ekspresija tioredoksina i glutaredoksina*

Za razliku od *GST*, relativna ekspresija gena za tioredoksin (*Trx* ili *Txn*) značajno je povećana početkom i sredinom dijapauze kod larvi na nižoj temperaturi.

Tioredoxini su visoko konzervisani mali proteini, koji učestvuju u održavanju redoks homeostaze ćelije kao univerzalni supstrati za oksidoreduktaze. Imaju brojne funkcije: učestvuju u popravci proteina preko metionin sulfoksid reduktaza, deluju antiapoptotski, učestvuju u regulaciji aktivnosti transkripcionih faktora (npr. NF- $\kappa$ B), zaštiti od hiperoksije i anoksije izazvane ishemijom tkiva i uklanjaju vodonik-peroksid. Imaju značajnu antiagregacionu ulogu, jer sprečavaju nastanak novih inter- i intramolekulskih disulfidnih mostova među proteinima, kao posledice oksidacije bočnih ostataka (Arner i Holmgren, 2000).

Redukcija tioredoksina pomoću tioredoksin reduktaze, vrste NADPH-zavisnog flavoproteina, odvija se isključivo uz oksidaciju NADPH. Povećana koncentracija NADP<sup>+</sup> i povećana ekspresija *Trx*, početkom i sredinom dijapauze kukuruznog plamenca, mogu biti u pozitivnoj korelaciji i zahtevaju dalja istraživanja. Naime, NADPH nastaje u pentozo-fosfatnom putu koji je intenzivan početkom dijapauze *O. nubilalis* (Stanić i dr., 2004; Blagojevic, 2007), a koji ima značajnu ulogu kao izvor redukujućih ekvivalenata. NADPH se koristi u biosintezi glicerola i u antioksidativnoj zaštiti, za regeneraciju malih, redukujućih molekula – glutaciona, tioredoksina, askorbinske kiseline i drugih (Nordin i dr., 1984; Kojic i dr., 2009).

Povećana ekspresija tioredoksina utvrđena je i kod žabe *R. sylvatica* nakon izlaganja niskim temperaturama i mržnjenju, kod anhidrobiotske larve dvokrilca *Polypedilum vanderplanki* u dehidratisanom stanju, kao i kod azijske medonosne pčele *Apis cerana cerana* pri povećanju oksidativnog stresa (Storey i Storey, 2013; Cornette i Kikawada, 2011; Yao i dr., 2014).

U eksperimentu sa vrstom bumbara, *Bombus ignitus*, izlaganim niskoj temperaturi i vodonik-peroksidu, u masnom telu se povećava ekspresija gena tioredoksinu-sličnog proteina (Choi i dr., 2006). Slično, povećanje ekspresije tioredoksina utvrđeno je i u masnom telu larvi svilene bube, *Bombyx mori*, u odgovoru na izlaganje vodonik-peroksidu, pesticidu parakvatu, visokim i niskim temperaturama, kao i infekciji NPV virusom (*engl.* nuclear polyhedrosis virus), bakterijom *Escherichia coli* i gljivicom *Beauveria bassiana* (Kim i dr., 2007).

S obzirom na to da je u ranijim istraživanjima na kukuruznom plamencu utvrđeno da se sredinom dijapauze značajno povećava količina vodonik-peroksida (Kojic i dr., 2009), moguće je da njegova produkcija podstiče povećanje ekspresije gena za tioredoksin, što je dobijeno u rezultatima ove disertacije i što je u skladu sa navedenim istraživanjima na drugim insekatskim vrstama (Choi i dr., 2006; Kim i dr., 2007).

Povećanje ekspresije tioredoksina može biti presudno za efikasan imuni odgovor posle infekcije (Aispuro-Hernandez i dr., 2008). Naime, u studiji na jestivom kineskom račiću *Fenneropenaeus chinensis* pokazano je da inficiranje WSS virusom



(*engl.* white spot syndrome virus) izaziva smanjenje ekspresije *Trx* koje vodi ka visokoj smrtnosti (Mohankumar i Ramasamy, 2006). Iz tog razloga, tokom dugotrajnih faza mirovanja organizama povećanje ekspresije i sinteze tioredoksina, osim kao vid antioksidativne zaštite, može doprinosti boljoj pripremljenosti organizma za moguće infekcije.

Takođe, zbog njihovih mnogobrojnih funkcija, tioredoksini mogu doprinosti i produžetku životnog veka, što je dokazano u studiji na nematodi *C. elegans*, kao i u studiji sa mutiranim miševima koji imaju prekomerno ekspresovane (*engl.* overexpressed) gene za *Trx* i *Trx*-vezujući protein (Oliveira i dr., 2009; Yoshida i dr., 2005). S tim u vezi, povećanje ekspresije tioredoksina može doprinosti preživljavanju u dijapauzi, ili bilo kom drugom stanju mirovanja, tokom kojeg se životni vek organizma produžava i do nekoliko puta.

Slično tioredoksinima, i glutaredoksini su mali proteini koji koriste glutation i NADPH tokom svog antioksidativnog dejstva. Novija istraživanja su pokazala da neke klase glutaredoksina mogu vezivati gvožđe u Fe-S klasterima i tako delovati preventivno, smanjujući dostupnost gvožđa u Fentonovoj i njoj sličnim reakcijama (Lilig i dr., 2008). Takođe, pokazano je da i glutaredoksini učestvuju u imunom odgovoru, kao i u zaštiti od hipoksije i reoksigenaciji tkiva, razvoju neurodegenerativnih oboljenja i nekih kancera (Lilig i dr., 2008). Iako su glutaredoksini i tioredoksini veoma slični u svom delovanju, isključivo glutaredoksini imaju dehidroaskorbat-reduktaznu aktivnost (DHAR) i učestvuju u regeneraciji važnog ćelijskog antioksidansa – vitamina C (Lilig i dr., 2008).

Za razliku od ekspresije *Trx*, ekspresija glutaredoksina (*Grx*) je bila viša kod larvi *O. nubilalis* iz D2t i D6 grupa, što ukazuje na pomeranje i vremensko usklađivanje ćelijskih komponenti antioksidativnog sistema zaštite, u cilju optimalnog korišćenja redoks aktivnih komponenti (redukcioni agenasa).

Ranije studije na *O. nubilalis* pokazale su da je aktivnost DHAR veća kod nedijapauzirajućih larvi u odnosu na dijapauzirajuće, kao i da postoji negativna korelacija između aktivnosti DHAR i glutation reduktaze (GR) kod dijapauzirajućih larvi (Jovanović-Galović i dr., 2004). Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji, koji su

pokazali veću ekspresiju *Grx* u grupama na višoj temperaturi (PD i D2t) u odnosu na dijapauzirajuće larve na nižoj temperaturi, u skladu su sa rezultatima prethodnih studija na *O. nubilalis*. Takođe, slični rezultati ekspresije su dobijeni kod srodne vrste moljca – orijentalnog kukurznog plamenca, *Ostrinia furnacalis*, čije larve 5. stupnja povećavaju ekspresiju *Grx2* gena u masnom telu (i u drugim tkivima) nakon izlaganja UV zracima, mehaničkim povredama, infekciji *E. coli*, gladovanju, visokim i niskim temperaturama (An i dr., 2013).

#### *Ekspresija feritina i metalotioneina*

Relativna ekspresija feritina i metalotioneina u masnom telu larvi *O. nubilalis* ima vrlo sličan obrazac: povećana je krajem dijapauze (D6) i kod dijapauzirajućih larvi na višoj temperaturi (D2t).

Iako ne znamo da li povećana transkripcija gena za feritin (*Fer*) i metalotionein (*Mtn*) tokom dijapauze kukurznog plamenca dovodi do povećane sinteze ovih proteina, ona može predstavljati adekvatan odgovor na brojne stresne promene koje se odvijaju tokom dijapauze.

U prilog ovome govore i brojne studije koje su potvrdile povećanje ekspresije feritina u različitim fazama mirovanja i u odgovoru na stres: u anhidrobiozi tardigrade *Milnesium tardigradum* (Schokraie i dr., 2012), tokom krioprotektivne dehidracije arktičke kolebole *M. arctica* (Clark i dr., 2009), u embrionalnoj dijapauzi ekstremofilne vrste račića *A. franciscana* (Chen i dr., 2007), u dijapauzirajućim juvenilnim jedinkama račića *Calanus finmarchicus* (Tarrant i dr., 2008), u dijapauzirajućim larvama parazitske ose *Nasonia vitripennis* (Wolschin i Gadau, 2009), u dijapauzirajućim lutkama muve *S. crassipalpis* i pamukove sovice *H. armigera* (Rinehart i dr., 2010; Bao i Xu, 2011), tokom anoksije i izlaganja niskim temperaturama dijapauzirajućih larvi muva *Eurosta solidaginis* i *Eurosta scudderiana* (Storey i Storey, 2010), kao i puževa *Littorina littorea* (English i Storey, 2003; Larade i Storey, 2004), a takođe i tokom zimske hibernacije šumske žabe *R. sylvatica* i barske kornjače *Chrysemys picta* (Storey, 2004; Storey, 2006).

U ovoj disertaciji dobijeni rezultati relativne ekspresije feritina su pokazali da je transkripcija *Fer* gena u dijapauzi *O. nubilalis* niska jedino kod larvi koje su dva meseca na niskoj temperaturi (D2), što se može dovesti u vezu sa povećanom produkcijom vodonik-peroksida u prvim mesecima dijapauze, kako je utvrđeno ranijim studijama (Kojic i dr., 2009).

Veza između ekspresije feritina i vodonik-peroksida poznata je i dobro objašnjena kod sisara, a ogleda se u IRP-posredovanoj recipročnoj regulaciji ekspresije feritina i receptora za transferin, dva važna proteina u metabolizmu gvožđa, koja je već opisana u uvodu (Haile, 1999). U prisustvu ROS, pre svih H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i NO, gvožđe-IRP1 kompleks se narušava, IRP1 protein se oslobađa i vezuje za IRE elemente na iRNK feritina (u 5' UTR regionu) i receptora za transferin (u 3' UTR regionu), što vodi do degradacije transkripata feritina, ali i stabilizacije transkripata transferina (Hanson i Leibold, 1999). Moguće je da se upravo takav način kontrole ekspresije feritina odvija i u dijapauzi kod *O. nubilalis*.

Osim ekspresije feritina, stres utiče na povećavanje i drugih proteina koji su u vezi sa metabolizmom gvožđa i drugih važnih metala. Kod dudovog dugonosog tvrdokrilca *Apriona germari* je pokazano da prekomerna koncentracija gvožđa i vodonik-peroksida, kao i izlaganje herbicidu parakvatu, povećavaju ekspresiju transferina, glavnog transportera gvožđa (Lee i dr., 2006).

Dalje, kod parazitske ose *N. vitripennis* pokazano je da se u inicijaciji larvalne dijapauze povećava ekspresija akonitaze (Wolschin i Gadau, 2009), a veza između akonitaze i metabolizma gvožđa je dobro poznata. U prisustvu gvožđa IRP1 protein doživljava velike konformacione promene i formira IRP1-gvožđe kompleks koji dobija aktivnost citoplazmatske akonitaze (Narahari i dr., 2000). S obzirom na to da akonitaza učestvuje u ciklusu trikarbonskih kiselina (CTK) i da svi do sada opisani insekatski IRP imaju akonitaznu aktivnost, zbog očuvanog gvožđe-sumpornog klastera, i da pripadaju IRP1 familiji (Nichol i dr., 2002), narušavanjem akonitaznog gvožđe-IRP1 kompleksa u prisustvu ROS može se kontrolisati ćelijski metabolizam. Kako je kod *O. nubilalis* u dijapauzi povećana sinteza vodonik-peroksida (Kojic i dr., 2009), moguće je da on narušavanjem

stabilnosti kompleksa Fe-IRP1 početkom dijapauze dovodi posredno do degradacije iRNK feritina (smanjen broj transkripata u D2 grupi) i moduliše CTK. Kasnije, tokom trajanja dijapauze, ekspresija *Fer* se postepeno povećava, što verovatno predstavlja zaštitu od oksidativnog stresa usled dehidracije i koncentrovanja jona gvožđa koji bi mogli učestvovati u Fentonovoj i njoj sličnim reakcijama.

Osim feritina, u dijapauzirajućim lutkama *S. crassipalpis* povećano se ekspresuju i metalotioneini (Rinehart i dr., 2010), što je u skladu sa rezultatima ekspresije *Mtn* gena u dijapauzi *O. nubilalis*. Takođe, ekspresija metalotioneina je povećana u hepatopankreasu i mišiću stopala morskog puža *Littorina littorea* tokom anoksije i izloženosti niskim temperaturama (English i Storey, 2003). Dalje, u mnogim eksperimentima je dokazana antiapoptotska uloga metalotioneina koji mogu da se u apo-Mtn obliku vezuju za tumor supresorski protein p53, da modulišu aktivnost izvršne kaspaze 3 (Ostrakovich i dr., 2006; Miyazaki i dr., 2006) ili da nakon translokacije u jedro štite genetički materijal od oštećenja tokom oksidativnog stresa (Nzengue i dr., 2009; Takahashi i dr., 2005).

Postoji više razloga zašto je povećanje ekspresije proteina koji učestvuju u regulaciji koncentracije metalnih jona važno za preživljavanje tokom mirovanja. Prvo, tokom mirovanja dolazi do dehidracije celog organizma i pojedinačnih tkiva, gubitka unutarćelijskih zaliha slobodne vode i hiperkoncentrovanja citoplazme. Takođe, u hipometaboličkom stanju, kakvo je dijapauza, dolazi do redukcije potrošnje energije što vodi do smanjenja rada jonskih pumpi, curenja jona, zatvaranja jonskih kanala za pasivan transport i povećanja oksidativnog stresa (Hochachka i Somero, 2002; Hand i Menze, 2008; Staples i Buck, 2009). S obzirom na to da su produkti oba gena, i feritina i metalotioneina, veoma važni za regulaciju koncentracije metalnih jona, povećanje njihove ekspresije u dijapauzi predstavlja vrstu ćelijskog odgovora na dehidraciju i oksidativni stres.

Tokom mirovanja organizmi su podložni infekcijama, jer su zbog gladovanja slabo aktivni i ranjivi. Zbog toga, feritinom posredovano uklanjanje jona gvožđa, koje je neophodno za rast i razvoj brojnih patogena (Pham i Winzerling, 2010),

predstavlja vid zaštite organizma. Osim toga, utičući na dostupnost različitih metala, metalotioneini mogu da modulišu ne samo ekspresiju gena preko Zn-zavisnih transkripcionih faktora (NF- $\kappa$ B), nego i aktivnost brojnih enzima kojima su neophodni metalni kofaktori (Babula i dr., 2002).

## 5.2.2 Ekspresija gena proteina toplotnog stresa

Iako uloga HSP proteina nije dovoljno proučena kod insekata, povećanje njihove ekspresije karakteristično je za mnoge faze mirovanja, kao i u odgovoru insekata na stres (Clark i Worland, 2008; MacRae, 2010). U ovoj disertaciji praćena je ekspresija četiri gena za HSP proteine: *Hsp90*, *Hsc70*, *Hsp20.4* i *Hsp20.1*, a rezultati su pokazali da je u odnosu na nedijapauzirajuću grupu relativna ekspresija svih gena povećana na kraju dijapauze. Tokom dijapauze na nižoj temperaturi kod svih gena se uočava postepen porast relativne ekspresije tokom trajanja dijapauze, što ukazuje na značajnu ulogu ovih proteina u adaptaciji na niske temperature.

Relativna ekspresija *Hsp90* je izuzetno visoka u svim grupama, a naročito kod dijapauzirajućih larvi koje su aklimatizovane na nižoj temperaturi. Dobijeni rezultati su u skladu sa povećanom ekspresijom transkripata *Hsp90* u dijapauzi kod lutki lukove muve *Delia antiqua* (Chen i dr., 2005) i larvi pirinčanog moljca *Chilo suppressalis* (Sonoda i dr., 2006). Sa druge strane, kod nekih vrsta je ekspresija *Hsp90* u dijapauzi smanjena i raste tek pred kraj mirovanja ili u razvoju nakon dijapauze, kako je to utvrđeno kod lutki muve *S. crassipalpis* (Rinehart i Denlinger, 2000), larvi plavozelene muve *Lucilia sericata* (Tachibana i dr., 2005) i lutki *Helicoverpa zea* (Zhang i Denlinger, 2010). Slično ovim studijama, i kod kukuruznog plamenca je utvrđen porast broja *Hsp90* transkripata krajem dijapauze, ali je ekspresija gena visoka tokom cele dijapauze.

Povećana ekspresija *Hsp90* može biti povezana sa brojnim procesima u kojima ovi proteini učestvuju kao što su – u pravilno savijanj, stabilizacija i međusobno povezivanje proteina, modulacija transkripcionih faktora i kinaza, kao i modulacija ćelijske komunikacije (MacRae, 2010).

Utvrđeno povećanje ekspresije *Hsp90* pred kraj ili nakon mirovanja može biti u vezi i sa ekdizonom. Naime, poznato je da homodimeri Hsp90 proteina inaktiviraju unutarćelijske receptore steroidnih hormona vezujući se za njih. Kod *D. melanogaster* uočeno je da prisustvo ekdizona dovodi do povećane, a nedostatak do smanjene ekspresije Hsp90 proteina (Thomas i Lengyel, 1986), kao i da Hsp90 ima ključnu ulogu u pravilnom formiranju receptora za ekdizon, što potvrđuje njegovu evolutivno očuvanu ulogu „signalnog šaperona“ kod eukariota (Arbeitman i Hogness, 2000).

Kako je u pionirskim studijama hormonalne regulacije dijapauze *O. nubilalis* utvrđeno da je koncentracija ekdizona veoma niska tokom dijapauze (Bean i Beck, 1983) i da injektiranje 20-hidroksiekdizona u dijapauzirajuće larve ne dovodi do terminacije dijapauze već do apolize (Beck i Shane, 1968), pretpostavljamo da povećana ekspresija *Hsp90*, koja je zabeležena u rezultatima ove disertacije, nije posledica uticaja ekdizona već odgovora na stres. Ipak, povećanje broja transkripata *Hsp90* tokom dijapauze, a naročito na kraju, može biti dobar vid pripreme larvi za izlazak iz faze mirovanja, nakon koje je moguća brza sinteza Hsp90 proteina koji je neophodan za efikasan završetak razvoja kukuruznog plamenca.

Ekspresija *Hsc70* gena je takođe povećana u dijapauzi *O. nubilalis*, osim na početku dijapauze u grupi aklimatizovanoj na 5°C (D2). S obzirom na to da bi *Hsc70* trebalo da se konstitutivno ekspresuje, povećana ekspresija ovog gena nije bila očekivana, ali je slično utvrđeno i kod drugih organizama. Kod bambusovog moljca, *Omphisa fuscidentalis*, vrste koja naseljava tropski region severnog Tajlanda i dijapauzira u stadijumu gusenice u sušnom periodu od septembra do maja, transkripcija *Hsc70* je niska u periodu pre početka i tokom prva 4 meseca dijapauze, a potom se sredinom dijapauze povećava, da bi postepeno opadala pred kraj (Tungjitwitayakul i dr., 2008). U studiji na muvi *S. crassipalpis* istovremeno je praćena ekspresija *Hsp70* i *Hsc70* gena i utvrđeno je da se oni različito ekspresuju kako u odgovoru na visoke i niske temperature, tako i u zavisnosti od perioda životnog ciklusa (Rinehart i dr., 2007). Pri izlaganju adulta temperaturi od 40°C povećava se ekspresija *Hsp70*, dok se pri izlaganju -10°C povećava ekspresija

*Hsc70*. Sa druge strane, u dijapauzirajućim lutkama ekspresija *Hsc70* se ne povećava, dok je ekspresija *Hsp70* konstantno visoka, bez obzira na temperaturu izlaganja. Ovakvi rezultati sugerišu da *Hsc70* i *Hsp70* proteini imaju razdvojene uloge u odgovoru na različite temperature (Rinehart i dr., 2000). Sa druge strane, izlaganje vatrene stenice (*Pyrrhocoris apterus*) niskim i visokim temperaturama vodi do značajno povećane ekspresije *Hsp70* i blago povećane ekspresije *Hsc70*. Utišavanje ekspresije *Hsp70* putem RNKi tehnologije vodi do smanjene otpornosti stenica na termalne šokove, dok kratkoročno izlaganje visokim temperaturama pokreće ekspresiju *Hsp70* i povećava otpornost organizma na niske temperature (Košťál i Tollarová-Borovanska, 2009). Takođe, ekspresija *Hsp70* je povećana i u dijapauzi larvi antarktičkog insekta, *B. antarctica* i utvrđeno je da je neophodna za preživljavanje ove vrste na niskim temperaturama (Rinehart i dr., 2006; Rinehart i dr., 2007).

Proteini iz familije *Hsp70/Hsc70* imaju važnu ulogu u savijanju nascentnih proteina, regulaciji proteinske degradacije, razvrstavanju proteina do odgovarajućeg subćelijskog odeljka, ćelijskoj deobi i stresom indukovanoj ekspresiji zaštitnih proteina (MacRae, 2010). Smatra se da *Hsp70* imaju ulogu svojevrsnog ćelijskog „termometra“ i da posreduju u oslobađanju transkripcionih faktora HSP proteina (HSF-1) koji se vezuju za HRE (*engl.* heat shock response element) čime se povećava ekspresija *Hsp* i drugih proteina (Hochacka i Somero, 2002). Za *Hsp70* je takođe utvrđeno da može smanjiti ili zaustaviti aktivaciju kaspaza, kao i sprečiti oštećenje mitohondrija i hromatina, delujući kao važan antiapoptotski protein (Kampinga i dr., 2009).

Mali proteini toplotnog stresa predstavljaju raznovrsne i brojne molekularne šaperone koji imaju tri zajedničke osobine: malu molekulsku masu (14–27 kDa), sekvencu homologu  $\alpha$ -kristalinskim proteinima i sposobnost formiranja velikih dinamičkih oligomernih kompleksa (Stetler i dr., 2010). Za formiranje oligomernih proteina od 9 do 50 subjedinica, koji učestvuju u pravilnom savijanju, povezivanju i transportu nosivih polipeptida, kao i u uklanjanju nefunkcionalnih proteina u ćeliji, neophodan je  $\alpha$ -kristalinski domen. Zbog toga se smatra da

povećana ekspresija malih HSP pojačava otpornost organizama na stres (Gkouvitsas i dr., 2008).

Rezultati Q-PCR analize u ovoj disertaciji su pokazali da je ekspresija *Hsp20.4* i *Hsp20.1* gena u dijapauzi gusenica *O. nubilalis* različita u odnosu na kontrolnu grupu. Ekspresija *Hsp20.4* je povećana u svim eksperimentalnim grupama, a ekspresija *Hsp20.1* se povećava tek u kasnoj dijapauzi. Količina transkripata oba gena povećava se postupno tokom dijapauze. Takođe, naročito visoku ekspresiju *Hsp20.4* imaju gusenice koje su u dijapauzi na višoj temperaturi. Kako su mali HSP veoma važni košaperoni i zaštitnici ćelija, njihova ekspresija praćena je i kod drugih organizama, ali su rezultati različiti i ne uočava se jedinstven obrazac ekspresije tokom dijapauze i odgovora na termalni stres.

Filogenetske analize HSP svilene bube *Bombyx mori* su pokazale da su mali HSP veoma divergentni, kako u broju gena, tako i u veličini produkata koje kodiraju, te se smatra da insekatske vrste imaju jedinstvene male HSP (Li i dr., 2009). U NCBI bazi postojeće EST sekvence malih HSP *O. nubilalis* su identifikovane na osnovu sličnosti sa *Hsp20.1* i *Hsp20.4* sekvencama svilene bube *Bombyx mori*. Takođe, za BmHSP20.4 je utvrđeno na osnovu amino-kiselinskog sastava da ima 83% homologije sa Hsp20.8 mediteranskog kukuruznog moljca *Sesamia nonagrioides* (Gkouvitsas i dr., 2008).

Analize su pokazale da je ekspresija *Hsp19.5* konstantna, a *Hsp20.8* promenljiva – povećana tokom inicijacije, smanjena sredinom i opet povećana krajem dijapauze *S. nonagrioides* (Gkouvitsas i dr., 2008). Slično tome, i kod severnog kućnog komarca *Culex pipiens* krajem adultne dijapauze povećan je broj transkripata malog HSP proteina (Robich i dr., 2007). Ovi rezultati se u velikoj meri podudaraju sa dobijenim rezultatima ekspresije malih HSP kod *O. nubilalis* u ovoj disertaciji.

Ekspresija malih HSP je povećana i u mirovanju drugih organizama, ne samo insekata. U dijapauzirajućim jajima rotifere *Brachionus plicatilis* utvrđeno je povećanje transkripcije *Hsp27* (Clark i dr., 2012), a kod račića *A. franciscana* povećanje gena za Hsp20.8 poznatijeg kao p26 (MacRae i dr., 2010). Kod *A. franciscana* utvrđeno je da p26 reguliše ćelijski ciklus sprečavajući deobu



vezivanjem za mitotski aparat, reguliše transkripciju drugih gena i ima značajnu antiapoptotsku ulogu u toku kriptobioze mirujućih embriona račića *A. franciscana* (MacRae i dr., 2010).

Ekspresija malih HSP nije uvek promenljiva u mirovanju i odgovoru na termalni stres – npr. transkripcija *Hsp23* se ne povećava tokom larvalne dijapauze *Lucilia sericata* (Tachibana i dr., 2005), kao ni ekspresija *Hsp23* i *Hsp26* u dijapauzi *Drosophila triauraria* (Goto i dr., 1998; Goto i Kimura, 2004), dok se *Hsp20.4* i *Hsp20.8* kod *B. mori* ekspresuju jednako visoko i u aktivnom razvoju i tokom embrionalne dijapauze, ali ne i posle termalnog stresa (Ponnuvel i dr., 2010). Proteomska analiza takođe je potvrdila da se mali HSP (19.9, 20.1, 20.4, 20.8, 21.4 i 23.7) visoko ekspresuju i u nedijapauzirajućim i u dijapauzirajućim jajima *B. mori* (Fan i dr., 2013).

S obzirom na to da je broj malih HSP proteina u organizmu veliki i da oni imaju različite uloge u ćeliji (pravilno savijanje, povezivanje, transport novosintetisanih polipeptida, uklanjanje nefunkcionalnih proteina, antiagregaciona zaštita tokom dehidracije, kontrola ekspresije, regulacija ćelijske deobe i smrti), zbog različite ekspresije gena za *Hsp20.4* i *Hsp20.1*, može se pretpostaviti da bi oni mogli imati različite uloge tokom dijapauze kukuruznog plamenca. Takođe, osim *Hsp20.4* i *Hsp20.1*, nesumnjivo je postojanje i drugih malih HSP kod *O. nubilalis* koji takođe mogu imati važnu ulogu u dijapauzi.

### 5.3 Ćelijska smrt i dijapauza

Gladovanje i produženo stanje hipometabolizma imaju dramatične efekte u sisarskim ćelijama – dovode do pada ATP-a, porasta AMP-a, zastoja u radu jonskih pumpi, curenja  $\text{Ca}^{2+}$  i drugih jona kroz membranu, remećenje membranskog potencijala mitohondrija i otvaranje kanala kroz koje se oslobađaju citohrom c i drugi proapoptotski proteini koji vode do aktivacije programirane ćelijske smrti (Hand i Menze, 2008; Menze i dr., 2005; Caro-Maldonado i Munoz-Pinedo, 2011).

Dijapauza predstavlja dugotrajan period gladovanja tokom kojeg se organizmi susreću sa brojnim stresnim izazovima – promenama u energetsom metabolizmu, dehidracijom, ekstremnim uslovima sredine, zaustavljanjem/smanjenim radom jonskih pumpi, zatvaranjem jonskih kanala i drugim (Košťál, 2006; Hahn i Denlinger, 2007; Staples i Buck, 2009; MacRae, 2010). Iako je metabolička supresija najdublja u embrionalnoj dijapauzi, organizmi koji ulaze u dijapauzu u stadijumu lutke, larve ili adulta bivaju pod većim stresom, jer imaju veće energetske potrebe i najčešće se ne hrane. Postavlja se pitanje na koji način organizmi izbegavaju ćelijsku smrt tokom faze mirovanja?

U potrazi za odgovorom kako se kontroliše ćelijska smrt u dijapauzi kukuruznog plamenca urađeno je više analiza: određena tkiva dijapauzirajućih larvi su bojena fluorescentnom DAPI bojom i posmatrana pod fluorescentnim mikroskopom, kako bi se proverilo da li se apoptoza manifestuje na morfološkom nivou. Esej fragmentisanosti DNK i aktivnost kaspazama sličnih enzima praćeni su u homogenatu lutki, nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih larvi na različitim temperaturama, kao i u homogenatu različitih tkiva dijapauzirajućih larvi. Takođe, Q-PCR metodom je praćena ekspresija različitih gena čiji produkti mogu učestvovati u regulaciji apoptoze.

Rezultati fluorescentne mikroskopije, upotrebom DAPI boje, pokazali su da na morfološkom nivou kod analiziranih tkiva dijapauzirajućih larvi nisu uočene apoptotske promene. Epidermis, svilene žlezde i masno telo su očuvani, s tim što je u masnom telu uočeno povećanje broja malih masnih kapljica, verovatno kao posledica intenzivnije lipolize tokom dijapauze. Analiza fragmentisanosti DNK

potvrdila je odsustvo apoptoze kod dijavauzirajućih larvi, umereno prisustvo kod nedijavauzirajućih larvi i intenzivno odvijanje ovog tipa ćelijske smrti u tkivima lutaka. Ipak, kako DAPI boja i esej fragmentisanosti DNK detektuju krajnje faze apoptoze, to ne znači da ćelijska smrt nije otpočela na biohemijskom nivou, što je provereno merenjem aktivnosti kaspaza.

S obzirom na to da na *O. nubilalis* niti drugim srodnim insektima nisu rađena slična istraživanja regulacije ćelijske smrti tokom mirovanja, ne postoje nikakvi podaci o tipovima kaspaza, niti molekulskim i biohemijskim osnovama regulacije njihove aktivnosti. S tim u vezi, zbog predostrožnosti biće korišćena sintagma *kaspazi X/Y slična aktivnost*.

Rezultati merenja aktivnosti kaspaza u homogenatima različitih stadijuma kukuruznog plamenca pokazala su da postoji aktivnost enzima sličnih sisarskim kaspazama, koja zavisi kako od životnog stupnja, tako i od tkiva i temperature na kojoj se organizam nalazi.

Značajna aktivnost kaspazi 9 i kaspazi 3 sličnih enzima detektovana je u homogenatu lutki i kod nedijavauzirajućih larvi, dok je kaspazi 8 slična aktivnost bila niska kod lutki, ali veća u nedijavauzirajućim larvama.

Aktivnost kaspaza se razlikuje kod dijavauzirajućih grupa, kako između različitih kaspaza, tako i među tkivima grupa koje su gajene na višoj i nižoj temperaturi. Značajna kaspazi 9 slična aktivnost detektovana je u homogenatu D2t larvi i masnom telu D2 larvi, dok je u epidermisu sa kutikulom kod obe grupe veoma niska. Takođe, značajnija kaspazi 8 slična aktivnost zabeležena je u epidermisu sa kutikulom D2t gusenica. Aktivnost izvršnih, kaspazi 3 sličnih enzima niska je tokom dijavauze, mada je blago povišena kod larvi koje su na sobnoj temperaturi.

Dobijeni rezultati potvrđuju da se apoptoza, ćelijska smrt, odvija tokom razvoja kukuruznog plamenca i da je verovatno posredovana enzimima sličnim, a moguće i homologim, sisarskim kaspazama 3, 8 i 9. Takođe, izmerena kaspazna aktivnost upućuje na to da su osnovni putevi aktivacije apoptoze kod *O. nubilalis* evolutivno očuvani i posredovani preko inicijatorskih kaspaza sličnih sisarskim. Sa druge

strane, razlike u aktivnosti ovih enzima među analiziranim tkivima ukazuju na to da su ovi, za sada, nedovoljno poznati procesi složeni i vrlo verovatno tkivno specifični.

Veća aktivnost enzima sličnih inicijatorskoj kaspazi 9 kod larvi koje su u dijapauzi na sobnoj temperaturi (D2t) u odnosu na larve na nižoj temperaturi (D2), najverovatnije predstavlja posledicu nepovoljnih metaboličkih promena koje se dešavaju kod D2t larvi i koje vode ka aktivaciji apoptoze i/ili drugih vrsta ćelijske smrti. Moguća posledica toga je nesposobnost izlaska iz dijapauze i visok mortalitet larvi iz ove grupe. Takođe, rezultati upućuju na to da se ključne promene, koje se negativno odražavaju na preživljavanje D2t grupe, verovatno dešavaju na mitohondrijama i mogu se manifestovati aktivacijom unutrašnjeg puta apoptoze.

Sa druge strane, povišena aktivnost kaspazi 9 sličnih enzima u masnom telu larvi na nižoj temperaturi verovatno predstavlja odraz kaspazom 9 aktivirane autofagije, za koju je poznato da se događa u sisarskim ćelijama u uslovima gladovanja (Allan i Clarke, 2009; Jeong i dr., 2011). Programirana autofagija masnog tela predstavljala bi logičnu adaptaciju na produženo gladovanje dijapauzirajućih larvi, a prema dobijenim rezultatima, moguće je da je aktivirana ili niskim temperaturama ili metaboličkim promenama u ovom tkivu tokom dijapauze. Sličan proces je zabeležen kod autofagije pljuvačnih žlezda vinske mušice (Martin i Baehrecke, 2004).

Niska aktivnost kaspazi 8 sličnih enzima u homogenatu celih larvi i u masnom telu obe dijapauzirajuće grupe sugerišu da kaspazi 8 slični enzimi verovatno imaju veći značaj u razvoju pre- i posle dijapauze, kao i u imunom odgovoru. Kod *D. melanogaster* je pokazano da Dredd, homolog sisarskoj kaspazi 8, ima ulogu u imunom odgovoru na infekciju Gram-negativnim bakterijama, a ne u ćelijskoj smrti, iako poseduje afinitet ka supstratu sa IETD amino-kiselinskom sekvencom (Leulier i dr., 2000).

Kod sisara različiti signalni molekuli uključeni u rast i razvoj (npr. TNF, TRAIL i dr.) vode do spoljašnjeg puta aktivacije apoptoze preko inicijatorske kaspaze 8, i zato

značajna aktivnost kaspazi 8 sličnih enzima u homogenatu nedijapauzirajućih larvi i njihovom epidermisu sa kutikulom može biti upravo posledica odgovora na slične stimuluse ili hormone u prepupalnom stadijumu lutanja (Jiang i dr., 1997; Partasarathy i Palli, 2007). Kako su gusenice nedijapauzirajuće grupe u programu aktivnog razvoja, aktivnost kaspazi 8 sličnih enzima deluje opravdana. Sa druge strane, njihova niža aktivnost u lutkama može se objasniti time da su apoptotski procesi već odmakli u izvršnu fazu, što i potvrđuje visoka aktivnost kaspazi 3 sličnih enzima.

Takođe, kod vinske mušice samo Dredd kaspaza ima prodomen sličan prodomenu kaspaze 8, ali za sada nije identifikovan protein koji ima homologiju sa DED domenom kaspaze 8 (Vernooy i dr., 2000). Zbog toga, kod vinske mušice ili ne postoji spoljašnji put aktivacije apoptoze preko membranskih receptora ili se, ako postoji, njegovi učesnici suštinski razlikuju od sisarskih. Vinske mušice poseduju membranski receptor Wengen koji, kao i receptori za TNF, sadrži očuvan region bogat cisteinom. Međutim, kada se prekomerno ekspresuje Eiger, homolog TNF-a, on se vezuje za Wengen i pokreće ćelijsku smrt, ali ne aktivacijom Dredd kaspaze, nego Dronc kaspaze, za koju se smatra da je ortolog sisarskoj kaspazi 9 (Moreno i dr., 2002). Moguće je da se slični procesi odvijaju i kod *O. nubilalis*, jer je ekspresija *TNF* gena povećana u dijapauzi, što može biti u vezi sa aktivnošću enzima sličnih kaspazi 9, a ne kaspazi 8.

Viša aktivnost inicijatorskih kaspaza u dijapauzi *O. nubilalis*, u odnosu na efektorsku kaspazu, upućuje na to da verovatno postoje mehanizmi koji sprečavaju dalju aktivaciju izvršnih kaspaza i otpočinjanje krajnje, proteolitičke faze apoptoze.

Jedan od mogućih načina supresije izvršnih kaspaza homologih kaspazi 3 u toku dijapauze jeste pomoću proteina toplotnog stresa (Hsp) koji, kao npr. Hsp27, deluju inhibitorno na kaspazu 3, a ne utiču na aktivnost inicijatorske kaspaze 9 (Pandey i dr., 2000). Takođe, inhibicija se verovatno i kod *O. nubilalis* odvija preko različitih IAP proteina, koji su evolutivno očuvani. Ipak, genska ekspresija inhibitora Bax proteina koja je analizirana u ovoj disertaciji nije u potpunosti u korelaciji sa aktivnošću kaspaza. Naprotiv, ekspresija gena inhibitora Bax proteina je povećana

u D2t, a smanjena u D2 grupi, za razliku od aktivnosti kaspaza koja se statistički ne razlikuje značajno među ovim grupama.

Rezultati istraživanja regulacije aktivnosti kaspaza kod račića *A. franciscana* takođe mogu pomoći u tumačenju aktivnosti kaspaza kod *O. nubilalis*. Istraživanja na dijapauzi ove vrste ekstremofilnog račića su pokazala da se aktivnost kaspaza može modulirati različitim koncentracijama adenin nukleotida, pre svega ATP-a i ADP-a. Naime, utvrđeno je da je kaspaza 9 kod ove vrste naročito osetljiva na ADP, koji je inhibiše u svim koncentracijama, dok je ATP aktivira u nižim, a inhibiše u višim koncentracijama (Menze i Hand, 2007). Moguće je da se sličan scenario odvija i kod *O. nubilalis*, jer u prvim mesecima dijapauze koncentracija AMP-a raste, a ATP-a opada.

Zanimljivo je da mitohondrije ovog račića podnose mnogo više koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  jona u citoplazmi nego sisarske, što im omogućava da izbegavaju  $\text{Ca}^{2+}$  posredovano otvaranje kanala na mitohondrijama i aktivaciju unutrašnjeg puta apoptoze. Takođe, kaspaza 3 i 9 u dijapauzi *A. franciscana* nisu osetljive na prisustvo citohroma *c*, što je potvrđeno i kod SF9 ćelija iz vrste moljca *Spodoptera frugiperda* (Kumarswamy i dr., 2009). Iako nisu prikazani u ovoj disertaciji, rezultati testiranja uticaja citohroma *c* i ATP-a na aktivnost kaspazi 9 sličnih enzima u larvama kukuruznog plamenca sugerišu da citohrom *c* ne utiče na aktivnost ove kaspaze. Refraktornost kaspazi 9 sličnih enzima prema citohromu *c* mogla bi biti posledica toga što se, tokom dijapauze i izlaganja niskim temperaturama, u larvama kukuruznog plamenca *O. nubilalis* broj mitohondrija smanjuje (Jovanović-Galović, 1997), a samim tim i količina citohroma *c* koji bi mogao aktivirati unutrašnji put.

## **6. ZAKLJUČCI**

Cilj ove teze je bio da se prouče molekulske i biohemijske osnove dijapauze kukuruznog plamenca *Ostrinia nubilalis* praćenjem promena koje se dešavaju pre ulaska u dijapauzu (PD), tokom dijapauze (D2, D4, D6), kao i praćenjem uticaja temperature na kojoj larve dijapauziraju (D2t/D2), a sve to u poređenju sa nedijapauzirajućim larvama.

*Na osnovu rezultata u vezi sa prometom vode, tačkom superhlađenja i osmolalnošću hemolimfe mogu se izvesti sledeći zaključci:*

- ❖ izlaganje niskim temperaturama i dužina trajanja dijapauze odražavaju se na količinu i promet vode u tkivima, kao i na kriobiološke parametre – tačku superhlađenja i osmolalnost hemolimfe;
- ❖ količina ukupne vode se smanjuje tokom dijapauze – brzo i intenzivno kod gusenica na višoj temperaturi (D2t) u odnosu na gusenice na nižoj temperaturi (D2, D4, D6);
- ❖ sadržaj ukupne i osmotski aktivne vode se smanjuje, a sadržaj osmotski neaktivne vode raste ili se ne menja u analiziranim tkivima dijapauzirajućih gusenica;
- ❖ sadržaj vode se ne menja značajno u masnom telu, dok svilene žlezde i epidermis sa kutikulom imaju jedan, a hemolimfa i srednje crevo drugi obrazac prometa vode u dijapauzi;
- ❖ voda se postepeno, brže ili sporije, gubi tokom dijapauze u svilenim žlezdama i epidermisu sa kutikulom, što verovatno predstavlja odraz gubitka vode na nivou celog organizma;
- ❖ u hemolimfi i srednjem crevu promet vode se specifično menja u dijapauzi, jer sredinom dijapauze dolazi do porasta sadržaja ukupne vode, uglavnom zbog povećanja količine osmotski neaktivne vode;
- ❖ povećanje vode sredinom dijapauze u hemolimfi i srednjem crevu je posledica kako intenzivne glikogenolize i lipolize, koje su intenzivne u ovom periodu, tako i posledica otpuštanja vode iz drugih tkiva usled razmene sa glicerolom iz hemolimfe;



- ❖ visoka koncentracija glicerola u hemolimfi doprinosi kako smanjenju tačke superhlađenja svih tkiva, tako i čuvanju vode u hemolimfi i debelom crevu, jer glicerol vezuje za sebe slobodnu vodu i prevodi je u osmotski neaktivnu formu, čime smanjuje gubitak vode iz ovog tkiva;
- ❖ nizak sadržaj vode na kraju dijapauze posledica je dugotrajne dehidracije usled gladovanja, ali i nemogućnosti korišćenja metaboličke vode vezane za glikogen, koji se u ovom periodu ponovo sintetiše u sklopu pripreme za izlazak iz dijapauze.

*Na osnovu koncentracije različitih nukleotida, energetskog naboja, aktivnosti citohrom c oksidaze i relativne ekspresije gena čiji produkti su u vezi sa energetskim metabolizmom i biogenezom mitohondrija, mogu se izvesti sledeći zaključci:*

- ❖ izlaganje niskim temperaturama i dužina trajanja dijapauze značajno utiču na energetski metabolizam larvi;
- ❖ metabolička aktivnost je smanjena u larvama koje su bile u dijapauzi na nižoj temperaturi (5°C), što je naročito izraženo u početnim mesecima dijapauze (D2);
- ❖ pad energetskog naboja je posledica promene odnosa koncentracija adenin nukleotida, a naročito posledica porasta koncentracije AMP-a koji na početku dijapauze verovatno učestvuje, posredstvom AMP-zavisne protein kinaze, u supresiji metabolizma;
- ❖ odnos NAD<sup>+</sup>/NADP<sup>+</sup> koenzima je odraz metaboličkih promena u larvama – NAD<sup>+</sup> je zastupljeniji kod nedijapauzirajućih (ND i PD), a NADP<sup>+</sup> kod dijapauzirajućih larvi, naročito na početku dijapauze (D2), kada je intenzivan pentozo-fosfatni put;
- ❖ promene u koncentraciji GMP-a i UMP-a teško se mogu objasniti zbog nedostatka literaturnih podataka, ali se može pretpostaviti da je izuzetno visoka koncentracija UMP-a početkom dijapauze verovatno posledica istovremene intenzivne razgradnje glikogena i sinteze trehaloze u kojima učestvuje UDP-glukoza;

- ❖ ekspresija analiziranih gena čiji produkti su u vezi sa energetske metabolizmom prati energetske potrebe organizma i dinamiku biogeneze mitohondrija tokom životnog ciklusa *O. nubilalis* – veća je kod larvi na 22°C (PD i D2t), smanjena početkom dijapauze na 5°C (D2), a potom postepeno raste tokom dijapauze (D4 i D6).

*Na osnovu rezultata relativne ekspresije gena čiji produkti su u vezi sa odgovorom na stres mogu se izvesti sledeći zaključci:*

- ❖ ekspresija većine analiziranih gena, sem za glutation *S*-transferazu i *Hsp20.1*, povećana je u dijapauzi, kako na višoj, tako i na nižoj temperaturi;
- ❖ tokom dijapauze na nižoj temperaturi, sem u slučaju tioredoksina, kod svih gena je uočena manja ekspresija početkom dijapauze i povećanje broja transkripata tokom mirovanja;
- ❖ glutation *S*-transferaza verovatno ima važniju ulogu u detoksikaciji tokom aktivnog hranjenja larvi, nego u mirovanju kada ima smanjenu ekspresiju koja se, ipak, povećava pred kraj dijapauze;
- ❖ tioredoksini i glutaredoksini verovatno imaju slične uloge, ali u različitim periodima razvoja;
- ❖ ekspresija gena za tioredoksin ukazuje na važnost ovog proteina u antioksidativnoj zaštiti u prvim mesecima dijapauze, jer je istovremena sa visokom aktivnošću pentozo-fosfatnog puta i visokom koncentracijom NADP<sup>+</sup>;
- ❖ ekspresija gena za glutaredoksin ukazuje na to da on ima važniju ulogu kada je metabolizam intenzivniji – na višoj temperaturi i u aktivnom periodu;
- ❖ promet metalnih jona je izuzetno važan tokom dijapauze, o čemu svedoči povećana ekspresija gena za feritin i metalotionein, koji vezivanjem metala mogu uticati ne samo na regulaciju redoks stanja, već i metabolizma i ekspresije drugih gena;

- ❖ ekspresija gena za proteine toplotnog stresa, sem *Hsp20.1*, povećana je u dijapauzi, naročito na nižim temperaturama, ukazujući na njihov značaj u odgovoru na termalni stres i adaptaciju na uslove hipometabolizma;
- ❖ suštinski različita ekspresija *Hsp20.4* i *Hsp20.1* ukazuje na njihove različite uloge tokom dijapauze i aktivnog razvoja larvi;
- ❖ postepeno povećanje broja transkripata tokom dijapauze verovatno je posledica istovremenih procesa – povećane ekspresije i produžetka poluživota iRNK, koji zajednički doprinose boljoj pripremi organizma za izlazak iz dijapauze, kada je sinteza proteina ubrzana i olakšana zbog postojanja brojnih iRNK.

*Na osnovu rezultata dobijenih fluorescentnom mikroskopijom, analizom fragmentisanosti DNK, merenjem aktivnosti kaspaza i ekspresije pojedinih gena u vezi sa apoptozom mogu se izvesti sledeći zaključci:*

- ❖ *Ostrinia nubilalis* poseduje enzime koji imaju aktivnost sličnu sisarskim kaspazama 3, 8 i 9;
- ❖ najviše izmerene aktivnosti su u stadijumu lutke i nedijapauzirajućih larvi, što je u skladu sa promenama koje se odigravaju tokom preobražaja;
- ❖ u dijapauzi je ustanovljena aktivnost kaspaza, pre svih onih kaspaza sličnih kaspazi 9, ali ne i aktivnost izvršnih enzima, sličnih kaspazi 3;
- ❖ temperature na kojoj gusenice miruju imaju izvesnog uticaja na aktivnost kaspaza, što ukazuje na složenost mehanizama regulacije ćelijske smrti u dijapauzi;
- ❖ krajnje faze programirane ćelijske smrti, uprkos aktivnosti inicijatorskih enzima, izostaju u dijapauzi, što upućuje na postojanje mehanizama koji sprečavaju aktiviranje izvršnih enzima.

Na kraju, poređenjem dobijenih rezultata svih analiza kod larvi koje su u dijapauzi na 22°C (D2t) mogu se izvesti sledeći zaključci:

- ❖ visoka aktivnost COX, nizak sadržaj ATP i ADP nukleotida, visoka ekspresija analiziranih gena u vezi sa metabolizmom mitohondrija ukazuju na neobično visoku stopu metabolizma za stanje mirovanja;
- ❖ sadržaj vode je nizak, kako zbog aktivnog metabolizma i intenzivne dehidracije, tako i zbog nerazvijenih antidehidracionih kriobioloških mehanizama;
- ❖ visoka ekspresija većine gena čiji produkti učestvuju u zaštiti od stresa, kao i povećana aktivnost kaspazi 9 sličnih enzima ukazuju na to da se ove larve nalaze u nepovoljnim, stresnim uslovima koji, verovatno, vode ka aktivaciji ćelijske smrti;
- ❖ sve opisane metaboličke karakteristike D2t larvi zajedno doprinose visokoj stopi smrtnosti, što ukazuje da je izlaganje larvi kukuruznog plamenca *Ostrinia nubilalis* niskim temperaturama u dijapauzi neophodno za njeno uspešno održavanje i preživljavanje stresa tokom mirovanja.

Buduća istraživanja dijapauze kukuruznog plamenca *O. nubilalis* treba usmeriti ka detaljnijem proučavanju osobina mitohondrija tokom dijapauze: morfoloških karakteristika, osetljivosti na Ca<sup>2+</sup> i prisustva konstituenata MPTP kanala.

Poseban napor treba uložiti za dobijanje sekvence čitavog genoma *O. nubilalis*, bez koje je rad na ovom model organizmu, značajnom za istraživanje dijapauze i otpornosti na hladnoću, veoma otežan.

## **7. LITERATURA**

**A**

Ai, L.S. and Chau, L.Y. (1999) Posttranscriptional regulation of H-ferritin mRNA. Identification of a pyrimidine-rich sequence in the 3'-untranslated region associated with message stability in human monocytic THP-1 cells. *J Biol Chem* 274(42):30209–30214.

Aispuro-Hernandez, E., Garcia-Orozco, K.D., Muhlia-Almazan, A., Del-Toro-Sanchez, L., Robles-Sanchez, R.M., Hernandez, J., Gonzalez-Aguilar, G., Yepiz-Plascencia, G. and Sotelo-Mundo, R.R. (2008) Shrimp thioredoxin is a potent antioxidant protein. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 148(1):94–99.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2002) Programmed Cell Death (Apoptosis), *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science.

Allan, L.A., and Clarke, P.R. (2009) Apoptosis and autophagy: Regulation of caspase-9 by phosphorylation. *FEBS J* 276(21):6063–73.

An, S., Zhang, Y., Wang, T., Luo, M. and Li, C. (2013) Molecular characterization of glutaredoxin 2 from *Ostrinia furnacalis*. *Integr Zool* 8 (suppl. 1):30–38.

Andrews, S.C., Arosio, P., Bottke, W., Briat, J.F., von Darl, M., Harrison, P.M., Lahlère, J.P., Levi, S., Lobreaux, S. and Yewdall, S.J. (1992) Structure, function, and evolution of ferritins. *J Inorg Biochem* 47(3–4):161–174.

Arbeitman, M.N. and Hogness, D.S. (2000) Molecular chaperones activate the *Drosophila* ecdysone receptor, an RXR heterodimer. *Cell* 101:67–77.

Arner, E.S.J. and Holmgren, A. (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* 267:6102–6109.

Artal-Sanz, M. and Tavernarakis, N. (2009) Prohibitin couples diapause signalling to mitochondrial metabolism during ageing in *C. elegans*. *Nature* 461:793–800.

Artal-Sanz, M., Tsang, W., Willems, E., Grivell, L., Lemire, B., Van der Spek, H., Nijtmans, L. and Sanz, M. (2003) The mitochondrial prohibitin complex is essential for embryonic viability and germline function in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 278:32091–32099.

Atanesyan, L., Günther, V., Celniker, SE., Georgiev, O. and Schaffner, W. (2011) Characterization of MtnE, the fifth metallothionein member in *Drosophila*. *J Biol Inorg Chem* 16(7):1047–1056.

## B

Babula, P., Masarik, M., Adam, V., Eckschlager, T., Stiborova, M., Trnkova, L., Skutkova, H., Provaznik, I., Hubalek, J. and Kizek, R. (2012) Mammalian metallothioneins: properties and functions. *Metallomics* 4:739–750.

Baca, F., Gosic-Dondo, S., Kaitovic, Z. and Hadgistevic, D. (2007) European corn borer (*Ostrinia nubilalis*, Hbn) population fluctuation at Zemun polje between 1986 and 2005. *Maydica* 52:325–328.

Bale, J.S. (2002) Insects and low temperatures: from molecular biology to distributions and abundance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357(1423):849–862.

Bao, B. and Xu, WH. (2011) Identification of gene expression changes associated with the initiation of diapause in the brain of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *BMC Genomics* 12:224.

Baskin, S.I. and Salem, H. (1997) Oxidants, Antioxidants and Free Radicals. Taylor & Francis, Washington, USA.

Bean, D.W. and Beck, S.D. (1983) Haemolymph ecdysteroid titres in diapause and non-diapause larvae of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *J Insect Physiol* 29(9):687–693.

Beck, S.D. and Hanec, W. (1960) Diapause in the European corn borer, *Pyrausta nubilalis* (Hubn). *J Insect Physiol* 4:304–318.

- Beck, S. and Shane, J. (1968) Effects of ecdysones on diapause in the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *J Insect Physiol* 15(5):721–730.
- Beere, H.M. (2004) 'The stress of dying': the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J Cell Sci* 117:2641–6951.
- Bělín, V. (2003) Noční motýli České a Slovenské republiky. Nakladatelství Kabourek, Zlín, 1-260.
- Bemani, M., Izadi, H., Mahdian, K., Khani, A. and Amin, M. (2012) Study on the physiology of diapause, cold hardiness and supercooling point of overwintering pupae of the pistachio fruit hull borer, *Arimania comaroffi*. *J Insect Physiol* 58:897–902.
- Benoit, J.B. (2010) Water management by dormant insects: comparisons between dehydration resistance during summer aestivation and winter diapause. *Prog Mol Subcell Biol* 49:209–29.
- Bergendi, L., Benes, L., Durackova, Z. and Ferenck, M. (1999) Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 65:1865–1874.
- Bernardi, P., Colonna, R., Costantini, P., Eriksson, O., Fontaine, E., Ichas, F., Massari, S., Nicolli, A., Petronilli, V. and Scorrano, L. (1998) The mitochondrial transition permeability. *Biofactors* 8:273–281.
- Blagojević, D. (2007) Antioxidant systems in supporting environmental and programmed adaptations to low temperatures. *CryoLett* 28(3):137–50.
- Blagojević, D.P. and Grubor-Lajšić, G. (2000) Multifunctionality of antioxidant system in insects. *Arch Biol Sci* 52(4):185–194.
- Block, W. (2003) Water or ice? – The challenge for invertebrate cold survival. *Sci Prog* 86(1–2):77–101.
- Bodnaryk, R. P. (1987) Dual control of pupal diapause by cyclic nucleotides in the bertha armyworm, *Mamestra configurata* Wlk. *J Insect Physiol* 33(1):33–37.



Brajković, M. (2004) Zoologija Invertebrata II deo. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd, 1-497.

Brajković, M. & Ćurčić, S. (2008) Opšta entomologija. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 1-311.

Briat, J.F., Lobreaux, S., Grignon, N. and Vansuyt, G. (1999) Regulation of plant ferritin synthesis: how and why. *Cell Mol Life Sci* 56:558–569.

Broughton B.R., Reutens D.C. and Sobey, C.G. (2009) Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* 40(5):e331–9.

Buck, L.T. (2004) Adenosine as a signal for ion channel arrest in anoxia-tolerant organisms. *Comp Biochem Physiol B* 139(3):401–414.

## C

Cain, K., Langlais, C., Sun, X.M., Brown, D.G. and Cohen, G.M. (2001) Physiological concentrations of K<sup>+</sup> inhibit cytochrome *c* dependent formation of the apoptosome. *J Biol Chem* 276:41985–41990.

Canavoso, E., Jouni, E., Karnas, J., Pennington, E. and Wells, A. (2001) Fat Metabolism in insects. *Annu Rev Nutr* 21:23–46.

Capdevila, M. and Atrian, S. (2011) Metallothionein protein evolution: a miniassay. *J Biol Inorg Chem* 16(7):977–989.

Capinera, J.L. (2000) European corn borer. University of Florida. EENY-156.

Carey, H. V., Sills, N. S. and Gorham, D. A. (1999) Stress proteins in mammalian hibernation. *Am Zool* 39:825–835.

Caro-Maldonado, A. and Munoz-Pinedo, C. (2011) Dying for something to eat: how cells respond to starvation. *Open Signaling J* 3:42–51.

Carpene, E., Andreani, G. and Isani, G. (2007) Metallothionein functions and structural characteristics. *J Trace Elem Med Biol* 21(S1):35–39.

- Carrasco, M.A., Tan, J.C. and Duman, J.G. (2011) A cross-species compendium of proteins/gene products related to cold stress identified by bioinformatic approaches. *J Insect Physiol* 57: 1127–1135.
- Chakrabortee S., Tripathi, R., Watson, M., Kaminski Schierle, G.S., Kurniawan, D.P., Kaminski, C.F., Wise, M.J. and Tunnacliffe, A. (2012) Intrinsically disordered proteins as molecular shields. *Molecular Biosystems* 8:210–219.
- Chasteen N.D. and Harrison, P.M. (1999) Mineralization in ferritin: an efficient means of iron storage. *J Struct Biol* 126(3):182–94.
- Chen, B., Kayukawa, T., Monteiro, A. and Ishikawa, Y. (2005) The expression of *Hsp90* gene in response to winter and summer diapauses and thermal-stress in the onion maggot *Delia antiqua*. *Insect Mol Biol* 14:697–702.
- Chen, T., Villeneuve, T.S., Garant, K.A., Amons R. and MacRae, T.H. (2007) Functional characterization of artemin, a ferritin homolog synthesized in *Artemia* embryos during encystment and diapause. *FEBS J* 274:1093–1101.
- Chippendale, G.M. (1977) Hormonal regulation of larval diapause. *Annu Rev Entomol* 28:91–108.
- Choi, Y.S., Lee, K.S., Yoon, H.J., Kim, I., Sohn, H.D. and Jin, B.R. (2006) A bumblebee thioredoxin-like protein gene that is up-regulated by a temperature stimulus and lipopolysaccharide injection. *Eur J Entomol* 103:291–296.
- Clark, M.S., Denekamp, N.Y., Thornem, M.A., Reinhardt, R., Drungowski, M., Albrecht, M.W., Klages, S., Beck, A., Kube, M., and Lubzens, E. (2012) Long-term survival of hydrated resting eggs from *Brachionus plicatilis*. *PLoS One* 7(1):e29365.
- Clark, M.S., Thorne, M.A.S., Purać, J., Burns, G., Hillyard, G., Popović, Ž.D., Grubor-Lajšić, G. and Worland, M.R. (2009) Surviving the cold: Molecular analyses of insect cryoprotective dehydration in the Arctic springtail *Megaphorura arctica* (Tullberg). *BMC Genomics* 10:328.

Clark, M.S. and Worland, M.R (2008) How insects survive the cold: molecular mechanisms – a review. *J Comp Physiol B* 178:917–933.

Clegg, J. (1997) Embryos of *Artemia franciscana* survive for years of continuous anoxia: the case for complete metabolic depression. *J Exp Biol* 200:467–475.

Coates, P., Jamieson, D., Smart, K., Prescott, S. and Hall, P. (1997) The prohibitin family of mitochondrial proteins regulate replicative lifespan, *Curr Biol* 7:607–610.

Colinet H., Nguyen A., Cloutier C., Michaud D., Hance T. (2007) Proteomic profiling of a parasitic wasp exposed to constant and fluctuating cold exposure. *Insect Biochem Mol Biol* 37:1177–1188.

Cooper, D.M., Granville, D.J. and Lowenberger, C. (2009) The insect caspases. *Apoptosis* 14:247–256.

Cornette, R. and Kikawada, T. (2011) The induction of anhydrobiosis in the sleeping chironomid: current status of our knowledge. *IUBMB life* 63(6):419–29.

Courtiade, J., Pauchet, Y., Vogel, H. and Heckel, D.G. (2011) A comprehensive characterization of the caspase gene family in insects from the order Lepidoptera. *BMC Genomics* 12:357.

Coyle, P., Philcox J. C., Carey, L. C. and Rofe A. M. (2002) Methallothionein: The multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci* 59:627–647.

## D

Danial, N.N. (2009) BAD: undertaker by night, candyman by day. *Oncogene* 27(S1):S53.

Danks, H.V. (1987) Insect Dormancy: An Ecological Perspective, *Biological Survey of Canada Press, Ottawa*.

Danks, H.V. (2000) Dehydration in dormant insects. *J Insect Physiol* 46:837–852.

Das, K.S. (2004) Thioredoxin system in premature and newborn biology. *Antiox Redox Signal* 6:177–184.

Day, R.M., Gupta, J.S. and MacRae T.H. (2003) A small heat shock/alpha-crystallin protein from encysted *Artemia* embryos suppresses tubulin denaturation. *Cell Stress Chaperones* 8(2):183–93.

Denlinger, D.L. (1985) Hormonal control of diapause. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds.), Pergamon Press, Oxford, *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 8:353–412.

Denlinger, D. (2002) Regulation of diapause. *Ann Rev Entom* 47:93–122.

Denlinger, D. (2008) Why to study diapause? *Entomol Research* 38:1–9.

Denlinger, D.L. (2009) Encyclopedia of Insects. In: Encyclopedia of Insects (Vincent H. Resh and Ring T. Cardé, editors). Elsevier, pp. 267–271.

Deveraux, Q.L. and Reed, J.C. (1999) IAP family proteins – supresors of apoptosis. *Genes Develop* 13:239–252.

Dolce V., Scarcia P., Iacopetta D. and Palmieri, F. (2005) A fourth ADP/ATP carrier isoform in man: identification, bacterial expression, functional characterization and tissue distribution. *FEBS Lett* 579:633–637.

Drummond, C.A., Vandock, K.P., Smith, S.L. and Fioravanti, C.F. (2010) Cyclic 3',5' guanosine monophosphate and larval midgut ecdysone 20-monooxygenase activity of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Comp Biochem Physiol B* 157(1):33–8.

## **E**

Eads, B.D. and Hand, S.C. (2003) Mitochondrial mRNA stability and polyadenylation during anoxia-induced quiescence in the brine shrimp *Artemia franciscana*. *J Exp Biol* 206:3681–3692.

Eddy, S.F., McNally, J.D. and Storey, K.B. (2005) Up-regulation of a thioredoxin peroxidase-like protein, proliferation-associated gene, in hibernating bats. *Arch Biochem Biophys* 435:103–111.

Edney, E.B. (1977) Water balance in land arthropods. Springer-Verlag, New York.

Elmore, S. (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35(4):495–516.

Eltzschig, H.K. (2013) Extracellular adenosine signaling in molecular medicine. *J Mol Med (Berl.)* 91(2):141–146.

English, T.E. and Storey, K.B. (2003) Freezing and anoxia stresses induce expression of metallothionein in the foot muscle and hepatopancreas of the marine gastropod, *Littorina littorea*. *J Exp Biol* 206(14):2517–2524.

## F

Fan, L., Lin, J., Zhong, Y. and Liu, J. (2013) Shotgun proteomic analysis on the diapause and non-diapause eggs of domesticated silkworm *Bombyx mori*. *PLoS One* 8(4):e60386.

Feinstein-Rotkopf, Y. and Arama, E. (2009) Can't live without them, can live with them: roles of caspases during vital cellular processes. *Apoptosis* 14:980–995.

Feng, Q., Davey, K.G., Pang, A.S.D., Ladd, T.R., Retnakaran, A., Tomkins, B. L., Zheng, S., Palli, S. R. (2001) Developmental expression and stress induction of glutathione S-transferase in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *J Insect Physiol* 47(1):1–10.

Fielding, D. (2006) Optimal diapause strategies of a grasshopper *Melanoplus sanguinipes*. *J Insect Sci* 6:02.

Formigari, A., Paolo, A., Cantale, V., Nadal, V.D., Feltrin, M., Ferronato, S., Santon, A., Schiavon, L. and Irato, P. (2008) Relationship Between Metal Transcription Factor-1 and Zinc in Resistance to Metals Producing Free Radicals. *Current Chem Biol* 2:256–266.

Fridovich, I. (1995) Superoxide radicals and superoxide dismutases, *Ann Rev Biochem* 64:97–112.

Friedecký, D., Tomková, J., Maier, V., Janost'áková, A., Procházka, and M., Adam, T. (2007) Capillary electrophoretic method for nucleotide analysis in cells: application on inherited metabolic disorders. *Cell Death Differ* 14(1):32–43.

Frova, C. (2006) Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. *Biomol Eng* 23(4):149–169.

Fujiwara, Y., Denlinger, D. L. (2007) High temperature and hexane break pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, by activating ERK/MAPK. *J Insect Physiol* 53(12):1276–1282.

## G

Gkouvitsas, T., Kontogiannatos, D. and Kourti, A. (2008) Differential expression of two small Hsps during diapause in the corn stalk borer *Sesamia nonagrioides* (Lef). *J Insect Physiol* 54:1503–1510.

Goddeeris, B.R., Vermeulen, A.C., de Geest, E., Jacobs, H., Baert, B. and Ollevier, F., (2001) Diapause induction in the third and fourth instar of *Chironomus riparius* (Diptera) from Belgian lowland brooks. *Arch Hydrobiol* 150:307–327.

Golstein, P. and Kroemer, G. (2007) Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *TRENDS in Biochem Sci* 32:37–43.

Gonin-Giraud, S., Mathieu, A.L., Diocou, S., Tomkowiak, M., Delorme, G. and Marvel, J. (2002) Decreased glycolytic metabolism contributes to but is not the inducer of apoptosis following IL-3-starvation. *Cell Death Differ* 9(10):1147–57.

Goto, S.G. and Kimura, M.T. (2004) Heat-shock-responsive genes are not involved in the adult diapause of *Drosophila triauraria*. *Gene* 326:117–122.

Goto, S.G., Yoshida, K.M. and Kimura, M.T. (1998) Accumulation of Hsp70 mRNA under environmental stresses in diapausing and nondiapausing adults of *Drosophila triauraria*. *J Insect Physiol* 44:1009–1015.

Goyal, K., Walton, L.J., Brown, J.A., Burnell, A.M. and Tunnacliffe, A. (2005) Molecular anhydrobiology: identifying molecules implicated in invertebrate anhydrobiosis. *Integ Comp Biol* 45:702–709.

Grubor-Lajšić, G. (1983) Biohemijsko proučavanje krioprotektivnog sistema insekata *Ostrinia nubilalis*, Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.

Grubor-Lajšic, G., Block, W., Palanacki, V. and Glumac, S. (1991) Cold hardiness parameters of overwintering diapause larvae of *Ostrinia nubilalis* in Vojvodina. Yugoslavia, *CryoLett* 12:177–182.

## H

Hadley, N.F. (1994a) Body water: content and management. In: *Water relations of terrestrial Arthropods*. Academic Press, USA, pp 18–56.

Hadley, N.F. (1994b) Ventilatory patterns and respiratory transpiration in adult terrestrial insects. *Physiol Zool* 67:175–189.

Hahn, D.A. and Denlinger, D.L. (2007) Meeting the energetic demands of insect diapause: Nutrient storage and utilization. *J Insect Physiol* 52:1213–1218.

Hahn, D.A. and Denlinger, D.L. (2011) Energetics of Insect Diapause. *Ann Rev Entomol* 56:103–121.

Haile, D. (1999) Regulation of genes of iron metabolism by the iron-response proteins. *Am J Med Sci* 318(4):230–240.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1999) Free radicals in biology and medicine (3<sup>rd</sup> ed). Oxford University Press.

Halestrap, A.P. and Brenner, C. (2003) The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr Med Chem* 10(16):1507–25.

- Hamburger, A.E., West, A.P.Jr, Hamburger, Z.A., Hamburger, P. and Bjorkman, P.J. (2005) Crystal structure of a secreted insect ferritin reveals a symmetrical arrangement of heavy and light chains. *J Mol Biol* 349(3):558–569.
- Hand, S.C. and Menze, M.A. (2008) Mitochondria in energy-limited states: mechanisms that blunt the signaling of cell death. *J Exp Biol* 211:1829–1840.
- Hanson, E. S. and Leibold, E. A. (1999) Regulation of the iron regulatory proteins by reactive nitrogen and oxygen species. *Gene Expr* 7(4–6):367–376.
- Hardie, D.G. (2007) AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(10):774–85.
- Hardie, D.G. and Hawley, S.A. (2001) AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *Bioessays* 23(12):1112–1119.
- Harrison, P.M. and Arosio, P. (1996) The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta* 1275:161–203.
- Hentze, M. (1996) Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *PNAS* 93(16):8175–8182.
- Hintze, K.J., Katoh, Y., Igarashi, K. and Theil, E.C. (2007) Bach1 repression of ferritin and thioredoxin reductase1 is heme-sensitive in cells and in vitro and coordinates expression with heme oxygenase1, beta-globin, and NADP(H) quinone (oxido) reductase1. *J Biol Chem* 282(2):34365–34371.
- Hochachka, P.W. and Somero, G.N. (2002) Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. Oxford University Press, UK.
- Hochachka, P.W., Lutz, P.L. (2001) Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comp Biochem Physiol B* 130:435– 459.
- Hoffmann, G.E., Hand, S.C (1990) Subcellular differentiation arrested in *Artemia* embryos under anoxia: evidence supporting a regulatory role of intracellular pH. *J Exp Zool* 71:1267–1270.



Holmgren, A. (1988) Thioredoxin and glutaredoxin: small multi-functional redox proteins with active-site disulfide bonds. *Biochem Soc Trans* 16(2):95–96.

Holmgren, A. and Fernandes, A.P. (2004) Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxid Redox Signal* 6(1):63–74.

## I

Internet 1. [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mitochondrial\\_electron\\_transport\\_chain\\_\(hrvatski\).png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mitochondrial_electron_transport_chain_(hrvatski).png), kreirano septembra 2011, preuzeto decembra 2013, izmenjeno.

Internet 2. <http://2.bp.blogspot.com>, preuzeto decembra 2013, izmenjeno.

Internet 3. <http://www.ent.iastate.edu/pest/cornborer>, preuzeto avgusta 2012, izmenjeno.

Itoi S., Kinoshita S., Kikuchi K., Watabe S. (2003) Changes of carp FoF1-ATPase in association with temperature acclimation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284:153–163.

Irwin, J.T. and Lee, R.E. (2000) Mild winter temperatures reduce survival and potential fecundity of the goldenrod gall fly, *Eurosta solidaginis* (Diptera: Tephritidae). *J Insect Physiol* 46(5):655–661.

Izumi, Y., Sonoda, S. and Tsumuki, H. (2007) Effects of diapause and cold-acclimation on the avoidance of freezing injury in fat body tissue of the rice stem borer, *Chilo suppressalis*. *J Insect Physiol* 53:685–690.

Izumi, Y., Sonoda, S., Yoshida, H., Danks, H.V. and Tsumuki, H. (2006) Role of membrane transport of water and glycerol in the freeze tolerance of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *J Insect Physiol* 52:215–220.

## J

Jeong, HS., Choi, H.Y., Lee, ER., Kim, JH., Jeon, K., Lee, HJ. and Cho, SG. (2011) Involvement of caspase-9 in autophagy-mediated cell survival pathway. *Biochim Biophys Acta* 1813(1):80–90.

Jiang, C., Baehrecke, E.H. and Thummel, C.S. (1997) Steroid regulated cell death during *Drosophila* metamorphosis. *Development* 124:4673–4683.

Joanisse, R. and Storey, K. (1994) Mitochondrial enzymes during overwintering in two species of cold-hardy gall insects. *Insect Biochem Mol Biol* 24:145–150.

Jovanović-Galović, A. (1997) Antioksidativni sistem kukuruznog plamenca (*Ostrinia nubilalis*, Hubn) u različitim stadijumima razvića: subcelijska distribucija i uloga antioksidanata u metamorfozi, Doktorska disertacija, PMF, Univerzitet u Novom Sadu.

Jovanović-Galović, A., Blagojević, D.P., Grubor-Lajsić, G., Worland, R. and 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(3):111–119.

Jovanović-Galović, A., Blagojević, D.P., Grubor-Lajsić, G., Worland, R. and 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(2):79–89.

Julie C.P., Paul, J.G. and Eric, R.G. (2005) Rapid induction of the intrinsic apoptotic pathway by L-glutamine starvation. *J Cell Physiol* 202(3):912–21.

**K**

Kampinga, H.H., Hageman J., Vos, M.J., Kubota, H., Tanguay, R.M., Bruford, E.A., Cheetham, M.E., Chen, B. and Hightower, L.E. (2009) Guidelines for nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperon* 14:105–111.

Kanzok, S.M., Fechner, A., Bauer, H., Ulschmid, J.K., Muller, H.M., Botella-Munoz, J., Schneuwly, S., Schirmer, R.H. and Becker, K. (2001) Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 291:643–646.

Keilin, D. (1959) The problem of anabiosis or latent life: history and current concept. *Proc. R. Soc. Lond. B* 150:149–191.

Kereši, T., Almaši, R., Milovac, Ž., Radonić, K. (2011) Dinamika leta kukuruznog plamenca (*Ostrinia nubilalis* Hübn.) u južnoj Bačkoj (1981-2010) i intenzitet napada u 2011. godini. XI Savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, 28.11.-02.12, Zbornik rezimea: 103.

Khani, A., Moharramipour, S., Barzegar, M. and Naderi-Manesh, H. (2007) Comparison of fatty acid composition in total lipid of diapause and non-diapause larvae of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Insect Sci* 14(2):125–131.

Kikuchi K., Itoi S., Watabe S. (1999) Increased levels of mitochondrial ATP synthase  $\alpha$ -subunit in fast skeletal muscle of carp acclimated to cold temperature. *Fish Sci* 65:629–636.

Kim, M., Robich, R.M., Rinehart, J.P. and Denlinger, D.L. (2006) Upregulation of two actin genes and redistribution of actin during diapause and cold stress in the Northern house mosquito, *Culex pipiens*. *J Insect Physiol* 52:1226–1233.

Kim, Y.J., Lee, K.S., Kim, B.Y., Choo, Y.M., Sohn, H.D. and Jin, B.R. (2007) Thioredoxin from the silkworm, *Bombyx mori*: cDNA sequence, expression, and functional characterization. *Comp Biochem Physiol B* 147(3):574–581.

- Kocmánková E., Trnka, M., Žalud, Z., Semerádová, D., Dubrovský, M., Muška, F. and Možný, M. (2008) Comparison of two mapping methods of potential distribution of pests under present and changed climate. *Plant Protect Sci* 44:49–56.
- Kojic, D., Spasojevic, I., Mojovic, M., Blagojevic, D., Worland, M.R., Grubor-Lajsic, G. and Spasic, M.B. (2009) Potential role of hydrogen peroxide and melanin in the cold hardiness of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Eur J Entomol* 106:451–454.
- Kojić, D. (2009) Otpornost na niske temperature i dehidrataciju kukuruznog plamenca (*Ostrinia nubilalis* Hbn.): ćelijski i molekularni odgovori. Doktorski rad, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad.
- Kojić, D., Purać, J., Popović, Ž.D., Pamer, E. and Grubor-Lajšić, G. (2010) The importance of body water management for winter cold survival of European corn borer *Ostrinia nubilalis* Hbn. (Lepidoptera:Pyralidae). *Biotech & Biotech Equip* 24(2):648–654.
- Kojima, Y., Binz, P-A. and Kägi, J. H. R. (1999) Nomenclature of metallothionein: Proposal for a revision. Book Chapter in Metallothionein IV (Editors: Klaassen C. D.), Series: Advances in Life Sciences, Birkhäuser Basel. pp.3–6.
- Koonin, E.V. (2000) How many genes can make a cell: the minimal-gene-set concept. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 1:99–116.
- Koštál, V. and Tollarová-Borovanská, M. (2009) The 70 kDa heat shock protein assists during the repair of chilling injury in the insect, *Pyrrhocoris apterus*. *PLoS One* 4(2):e4546.
- Koštál, V., Tollarová, M. and Doležel, D. (2008) Dynamism in physiology and gene transcription during reproductive diapause in a heteropteran bug, *Pyrrhocoris apterus*. *J Insect Physiol* 54:77–88.
- Koštál, V. (2006) Eco-physiological phases of insect diapause. *J Insect Physiol* 52:113–127.

Krauss S. (2001) Mitochondria: Structure and Role in Respiration In: Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.

Kregel, K. C. (2002) Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J App Physiol* 92:2177–2186.

Krunić, M. (1995) Zoologija invertebrata: II deo. VI izdanje. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd.

Kukal, O., Duman, G. and Serianni, S. (1989) Cold-induced mitochondrial degradation and cryoprotectant synthesis in freeze-tolerant arctic caterpillars. *J Comp Physiol B* 158:661–671.

Kültz, D. (2003) Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function. *J Exp Biol* 206:3119–24.

Kültz, D. (2005) Molecular and Evolutionary basis of the Cellular Stress Response. *Annu Rev Physiol* 67:225–57.

Kumar, S. (2007) Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ* 14:32–43.

Kumarswamy, R., Seth, R.K., Dwarakanath, B.S. and Chandna, S. (2009) Mitochondrial regulation of insect cell apoptosis: Evidence for permeability transition pore-independent cytochrome-c release in the Lepidopteran Sf9 cells. *Int J Bioch Cell Biol* 41:1430–1440.

## **L**

Lane, N. (2003) A unifying view of ageing and disease: the double-agent theory. *J Theoret Biol* 22:531–540.

Larade, K. and Storey, K.B. (2004) Accumulation and translation of ferritin heavy chain transcripts following anoxia exposure in a marine invertebrate. *J Exp Biol* 207(8):1353–1360.

- Lassance, JM. (2010) Journey in the *Ostrinia* world: from pest to model in chemical ecology. *J Chem Ecol* 36:1155–1169.
- Laufberger, V. (1937) Sur la cristallization de la ferritine. *Bull Soc Chim Biol* 19:1575–1582.
- Lee, K.S., Kim, B.Y., Kim, H.J., Seo, S.J., Yoon, H.J., Choi, Y.S., Kim, I., Han, Y.S., Je, Y.H., Lee, S.M., Kim, D.H., Sohn, H.D. and Jin, B.R. (2006) Transferrin inhibits stress-induced apoptosis in a beetle. *Free Radic Biol Med* 41(7):1151–1161.
- Leraut, P. J. A. (2012) Moths of Europe. 3. Moths of Europe – Zygaenids, Pyralids 1 and Brachodids. NAP Editions, Verrières-le-Buisson, 1-599.
- Leulier, F., Rodriguez, A., Khush, R.S., Abrams, J.M. and Lemaitre, B. (2000) The *Drosophila* caspase Dredd is required to resist Gram-negative bacterial infection. *EMBO reports* 4:353–358.
- Levi, S., Corsi, B., Bosisio, M., Invernizzi, R., Volz, A., Sanford, D., Arosio, P. and Drysdale, J. (2001) A human mitochondrial ferritin encoded by an intronless gene. *J Biol Chem* 276:24437–24440.
- Levi, S., Luzzago, A., Cesareni, G., Cozzi, A., Franceseschinelli, F., Albertini, A. and Arosio, P. (1988) Mechanism of iron uptake: activity of the H-chain and deletion mapping of ferro-oxidase site. A study of iron uptake and ferro-oxidase activity of human liver recombinant H-chain ferritins, and of two H-chain deletion mutants. *J Biol Chem* 263:18086–18092.
- Levine, B., Sinha, S. and Kroemer, G. (2008) Bcl-2 family members: Dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy* 4(5):600–606.
- Li, A. and Denlinger, L. (2008) Rapid cold hardening elicits changes in brain protein profiles of the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Insect Mol Biol* 17:565–572.
- Li, ZW., Li, X., Yu, QY., Xiang, ZH., Kishinom H. and Zhang, Z. (2009) The small heat shock protein (sHSP) genes in the silkworm, *Bombyx mori*, and comparative analysis with other insect sHSP genes. *BMC Evol Biol* 9:215.

Lillig, C.H., Berndt, C. and Holmgren, A. (2008) Glutaredoxin systems. *Biochim Biophys Acta* 1780(11):1304–1317.

Locke, M. and Nichol, H. (1992) Iron economy in insects. *Ann Rev Entomol* 37:195–215.

Lockshin, R.A. and Zakeri, Z. (2004) Apoptosis, autophagy, and more. *Intern J Biochem Cell Biol* 36:2405–2419.

Lutz, P.L. and Kabler, S. (1997) Release of adenosine and ATP in the brain of the freshwater turtle (*Trachemys scripta*) during long-term anoxia. *Brain Res* 769, 281–286.

Lutz, P.L. and Nilsson, G.E. (1997) Contrasting strategies for anoxic brain survival—glycolysis up or down. *J Exp Biol* 200:411–419.

## M

MacRae, T.H. (2010) Gene expression, metabolic regulation and stress tolerance during diapause. *Cell Mol Life Sci* 67:20405–2424.

Mali, B., Grohme, M., Förster, F., Dandekar, T., Schnölzer, M., Reuter, D., Wehnicz, W., Schill, R. and O Frohme, M. (2010) Transcriptome survey of the anhydrobiotic tardigrade *Milnesium tardigradum* in comparison with *Hypsibius dujardini* and *Richtersius coronifer*. *BMC Genomics* 11:168.

Margoshes, M. and Vallee, B.L. (1957) A cadmium protein from equine kidney cortex. *J Am Chem Soc* 79:4813–4814.

Martin, D.M. and Baehrecke, E.H. (2004) Caspases function in autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Develop* 131:275–284.

Matoničkin, I., Habdija, I., Primc-Habdija, B. (1999) Beskralješnjaci: biologija viših avvertebrata. III, dopunjeno izdanje. Škoska knjiga, Zagreb.

Matsuo, Y. (2006) Cost of prolonged diapauses and its relationship to body size in a seed predator, *Funct Ecol* 20:300–306.

McLeod, D.G.R. and Beck, S.D. (1963) Photoperiodic Termination of Diapause in an Insect. *Biol Bull* 124(1):84–96.

McMullen, D.C. and Storey, K.B. (2008) Mitochondria of cold hardy insects: responses to cold and hypoxia assessed at enzymatic, mRNA and DNA levels. *Insect Biochem Mol Biol* 38:367–373.

Menze, A.M., Hutchinson, K., Laborde, S.M. and Hand, S.C. (2005) Mitochondrial permeability transition in the crustacean *Artemia franciscana*: absence of a calcium-regulated pore in the face of profound calcium storage. *Am J Physiol Regul Comp Physiol* 289:68–76.

Menze, M.A. and Hand, S.C. (2007) Caspase activity during cell stasis: avoidance of apoptosis in an invertebrate extremophile, *Artemia franciscana*. *Am J Physiol Regul Comp Physiol* 292:2039–2047.

Merkwirth C., Dargazanli S., Tatsuta T., Geimer S., Lower B., Wunderlich F., Von Kleist-Retzow J., Waisman A., Westermann B. and Langer T. (2008) Prohibitins control cell proliferation and apoptosis by regulating OPA1-dependent cristae morphogenesis in mitochondria. *Genes Dev* 22:476–488.

Meyron-Holtz, E.G., Ghosh, M.C., Iwai, K., LaVaute, T., Brazzolotto, X., Berger, U.V., Land, W., Ollivierre-Wilson, H., Grinberg, A., Love, P. and Rouault, T.A. (2004) Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis. *EMBO J* 23(3):386–95.

Minniti, A.N., Cataldo, R., Trigo, C., Vasquez, L., Mujica, P., Leighton, F., Inestrosa, N.C. and Aldunate, R. (2009) Methionine sulfoxide reductase A expression is regulated by the DAF-16/FOXO pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 8(6):690–705.

Missirlis, F., Holmberg, S., Georgieva, T., Dunkov, B.C., Rouault, T.A. and Law, J.H. (2006) Characterization of mitochondrial ferritin in *Drosophila*. *PNAS* 103:5893–5898.



Miyazaki H., Oka N., Koga A., Ohmura H., Ueda T., Imaizumi T. (2006) Comparison of gene expression profiling in pressure and volume overload-induced myocardial hypertrophies in rats. *Hypertens Res* 29:1029–45.

Mohankumar, K. and Ramasamy, P. (2006) White spot syndrome virus infection decreases the activity of antioxidant enzymes in *Fenneropenaeus indicus*. *Virus Res* 115(1):69–75.

Moreno, E., Yan, M. and Basler, K. (2002) Evolution of TNF signaling mechanisms: JNK-dependent apoptosis triggered by Eiger, the *Drosophila* homolog of the TNF superfamily. *Current Biology* 12:1263–1268.

Morimoto, R.I. (1993) Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* 259 (5100):1409–10.

Mortensen, A., Skibsted, L.H., Sampson, J., Rice-Evans, C. and Everett, S.A. (1997) Comparative mechanisms and rates of free radical scavenging by carotenoid antioxidants. *FEBS Lett* 418:91–97.

Movassagh, M. and Foo, R. (2008) Simplified apoptotic cascades. *Heart Failure Rev* 13:111–119.

## N

Narahari, J., Ma, R., Wang, M., Walden, W. E. (2000) The aconitase function of iron regulatory protein 1. Genetic studies in yeast implicate its role in iron-mediated redox regulation. *J Biol Chem* 275(21):16227–16234.

Nation, J. (2008) *Insect physiology and biochemistry*. 2nd Edition. CRC Press.

Nichol, H., Law, J.H. and Winzerling, J.J. (2002) Iron metabolism in insects. *Ann Rev Entomol* 47:535–559.

Nichol, H.K. and Locke, M. (1990) The localization of ferritin in insects. *Tissue Cell* 22:767–777.

Nicotera, P. and Melino, G. (2004) Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene* 23(16):2757–65.

Nijtmans L., Artal Sanz M., Grivell L. and Coates, P. (2002) The mitochondrial PHB complex: roles in mitochondrial respiratory complex assembly, ageing and degenerative disease. *Cell Mol Life Sci* 59:143–155.

Nilsson, L. and Foloppe, N. (2004) The glutaredoxin -C-P-Y-C- motif: influence of peripheral residues. *Structure* 12(2):289–300.

Nordin, H., CUIZ, J. and YIN, C-M. (1984) Cold-induced glycerol accumulation by *Ostrinia nubilalis* larvae is developmentally regulated. *J Insect Physiol* 30:563–66.

Nylin, S. (2013) Induction of diapause and seasonal morphs in butterflies and other insects: knowns, unknowns and the challenge of integration. *Physiol Entomol* 38:96–104.

Nzengue, Y., Lefebvre, E., Cadet, J., Favier, A., Rachidi, W., Steiman, R. and Guiraud, P. (2009) Metallothionein expression in HaCaT and C6 cell lines exposed to cadmium. *J Trace Elem Med Biol* 23(4):314–323.

## O

Oliveira, R.P., Porter, A.J., Dilks, K., Landis, J., Ashraf, J., Murphy, C.T. and Blackwell, T.K. (2009) Condition-adapted stress and longevity gene regulation by *Caenorhabditis elegans* SKN-1/Nrf. *Aging Cell* 8(5):524–41.

Ostrakhovitch, E.A., Olsson, P.E, Jiang, S., Cherian, M.G. (2006) Interaction of metallothionein with tumor suppressor p53 protein. *FEBS Lett* 580:1235–1238.

Otsuka, F. (2004) Transcriptional regulation of metallothionein genes. *J Health Sci* 50(4):332–335.

**P**

Pandey, P., Farber, R., Nakazawa, A., Kumar, S., Bharti, A., Nalin, C., Weichselbaum, R., Kufe, D. and Kharbanda, S. (2000) Hsp27 functions as a negative regulator of cytochrome *c*-dependent activation of procaspase-3. *Oncogene* 19:1975–1981.

Parthasarathy, R. i Palli, S.R. (2007) Developmental and hormonal regulation of midgut remodeling in a lepidopteran insect, *Heliothis virescens*. *Mech Dev* 124(1):23–34.

Pelicano, H., Martin, D.S., Xu, R.H. and Huang, P. (2006) Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 25(34):4633.

Perez-Rafael, S., Kurz, A., Guriola, M., Capdevilla, M., Palacios, O. and Atrian, S. (2012) Is MtnE, the fifth *Drosophila* metallothionein, functionally distinct from the other members of this polymorphic protein family? *Metallomics* 4:342–349.

Pfaffl, M.W. (2000) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9):e45.

Pfaffl, M.W., Lange, I.G., Daxenberger, A. and Meyer, H.H. (2001) Tissue-specific expression pattern of estrogen receptors (ER): quantification of ER alpha and ER beta mRNA with real-time RT-PCR. *APMIS* 109(5):345–55.

Pham, D.Q.D. and Winzerling J.J. (2010) Insect ferritins – typical or atypical? *Biochim Biophys Acta* 1800(8):824–833.

Philogène, B. J. R. (2008) Diapause. In: Encyclopedia of Entomology 2<sup>nd</sup> edition. (John L. Capinera, editor), Springer, pp. 1206-10.

Podrabsky, J.E. and Hand, S.C. (1999) Bioenergetics of embryonic diapause in an annual killifish, *Astrofundulis limnaeus*. *J Exp Biol* 202:2567–2580.

Ponnuvel, K.M., Murthy, G.N., Awasthim A.K., Raom G. and Vijayaprakash, N.B. (2010) Differential gene expression during early embryonic development in diapause and non-diapause eggs of multivoltine silkworm *Bombyx mori*. *Indian J Exp Biol* 48(11):1143–1151.

Pop, C. and Salvesen, G.S. (2009) Human caspases: activation, specificity and regulation. *J Biol Biochem* 284:21777–21781.

Popović, Ž.D., Purać, J., Kojić, D., Pamer, E.L., Worland, M.R., Blagojević, D.P. and Grubor-Lajšić, G. (2011) Lea protein expression during cold-induced dehydration in the Arctic collembola *Megaphorura arctica*, *ArchBiol Sci* 63 (3):681–683.

Pottis, M. (1994) Desiccation tolerance in Prokaryotes. *Microbiol Rev* 58(4):755–805.

Purać, J. (2009) Molekularne osnove otpornosti polarnih insekata na niske temperature. Doktorski rad, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad.

Purves, D.C., Monserrate, J.P. and Brachmann, C.B. (2009) Cell death in *Drosophila*. In: *Essential of Apoptosis* (Eds: Yin, X.-M. i Dong, Z.).pp 375–405.

## R

Rajarapu, S. P. and Mittapalli, O. (2013) Glutathione-S-transferase profiles in the emerald ash borer, *Agrilus planipennis*. *Comp Biochem Physiol B* 165(1):66–72.

Ramaglia, V. and Buck, L.T. (2004) Time-dependent expression of heat shock proteins 70 and 90 in tissues of the anoxic western painted turtle. *J Exp Biol* 207:3775–3784.

Rasheva, V.I. and Domingos, P.M. (2009) Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis* 14:996–1007.

Reynolds, J.A. and Hand, S.C. (2004) Differences in isolated mitochondria are insufficient to account for respiratory depression during diapause in *Artemia franciscana* embryos. *Physiol Biochem Zool* 77(3):366–77.

Riedl, S.J. and Shi, Y. (2004) Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Mol Cell Biol* 5:897–907.

Riley, P.A. (1997) Melanin. *Int J Biochem Cell Biol* 29:1235–1239.

Rinehart, J.P. and 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., Hayward, S., Elnitsky, M.A., Sandro, L.H., Lee, R. Jr. and Denlinger, D.L. (2006) Continuous up-regulation of heat shock proteins in larvae, but not adults, of a polar insect. *PNAS* 103:14223–14227.

Rinehart, J.P., Li, A., Yocum, G.D., Robich, R.M., Hayward, S. and Denlinger, D.L. (2007) Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insect diapause. *PNAS* 104:11130–11137.

Rinehart, J.P., Robich, R.M. and Denlinger, D.L. (2010) Isolation of diapause-regulated genes from the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis* by suppressive subtractive hybridization. *J Insect Physiol* 56(6):603–609.

Rinehart, J.P., Yocum, G.D. and 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.

Robich, R.M, Rinehart, J.P., Kitchen, L.J. and Denlinger, D.L. (2007) Diapause-specific gene expression in the northern house mosquito, *Culex pipiens* L., identified by suppressive subtractive hybridization. *J Insect Physiol* 53(3):235–245.

Rozen S. and Skaletsky, H. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132:365–86.

Ruttkay-Nedecky, B., Nejdil, L., Gumulec, J., Zitka, O., Masarik, M., Eckschlager, T., Stiborova, M., Adam, V. and Kizek, R. (2013) The role of metallothionein in oxidative stress. *Int J Mol Sci* 14:6044–6066.

## S

Saikumar, P. and Venkatachalam, M.A. (2009) Apoptosis and cell death. *Basic Concepts of Molecular Pathology, Molecular Pathology Library* 2:29–40.

Sakulsak, N. (2012) Metallothionein: overview on its metal homeostatic regulation in mammals. *Int J Morphol* 30(3):1007–1012.

Schill, R. O., Pfannkuchen, M., Fritz, G., Kohler, H-R. and Brummer, F. (2006) Quiescent gemmules of the freshwater sponge, *Spongilla lacustris* (Linnaeus, 1759), contain remarkably high levels of Hsp70 stress protein and hsp70 stress gene mRNA. *J Exp Zool* 305:A449–A457.

Schokraie, E., Warnken, U., Hotz-Wagenblatt, A., Grohme, M.A., Hengherr, S., Förster, F., Schill, R.O., Frohme, M., Dandekar, T. and Schölzer, M. (2012) Comparative proteome analysis of *Milnesium tardigradum* in early embryonic state versus adults in active and anhydrobiotic state. *PLoS ONE* 7(9):e45682.

Scott, M.A., Locke, M and Buck, L.T. (2002) Tissue-specific expression of inducible and constitutive Hsp70 isoforms in the western painted turtle. *J Exp Biol* 206, 303–311.

Sekulić, R., Spasić, R. & Kereši, T. (2008) Štetočine povrća i njihovo suzbijanje. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu i Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad-Beograd, 1-212.

Semenza, G.L. (1999) Regulation of Mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:551–578.

Sherratt, P.J. and Hayes, J.D. (2001) Glutathione-S transferases. In *Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics* (Ed. Costas Ioannides), John Wiley and Sons Ltd., pp 319–352.

Shi, H., Bencze, K.Z., Stemmler, T.L. and Philpott, C.C. (2008) A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin. *Science* 320(5880):1207–1210.

- Sim, C. and Denlinger, D.L. (2008) Insulin signaling and FOXO regulate the overwintering diapause of the mosquito *Culex pipiens*. *PNAS* 105:6777–6781.
- Singtripop T., Saeangsakda M., Tatun N., Kaneko Y. and Sakurai S. (2007) Correlation of oxygen consumption, cytochrome *c* oxidase, and cytochrome *c* oxidase subunit I gene expression in the termination of larval diapause in the bamboo borer, *Omphisa fuscidentalis*. *J Insect Physiol* 53:933–939.
- Slamka, F. (2006) Pyraloidea of Europe (Lepidoptera). Volume 1. Pyralinae, Galleriinae, Epipaschiinae, Cathariinae & Odontiinae. František Slamka, Bratislava, 1-138.
- Slamka, F. (2008) Pyraloidea of Europe (Lepidoptera). Volume 2. Crambinae & Schoenobiinae. František Slamka, Bratislava, 1-223.
- Slamka, F. (2013) Pyraloidea of Europe (Lepidoptera). Volume 3. Pyraustinae & Spilomelinae. František Slamka, Bratislava, 1-357.
- Smith, E.H. and Kennedy, G.G. (2009) Encyclopedia of Insects. Encyclopedia of Insects. Elsevier, pp. 449–458.
- Sole, J., Sans, A., Riba, M. and Guerrero, A. (2010) Behavioral and electrophysiological responses of the European corn borer *Ostrinia nubilalis* to host-plant volatiles and related chemicals. *Physiol Entomol* 35:354–363.
- Sonoda, S., Fukumoto, K., Izumi, Y., Yoshida, H. and Tsumuki, H. (2006) Cloning of heat shock protein genes (hsp90 and Hsc70) and their expression during larval diapause and cold tolerance acquisition in the rice stem borer, *Chilo suppressalis*. *Arch Insect Biochem Physiol* 63:36–47.
- Stanic, B., Jovanovic-Galovic, A., Blagojevic, D.P., Grubor-Lajsic, G., Worland, R. and Spasic, M.B. (2004) Cold hardiness in *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera:Pyralidae): glycerol content, hexose monophosphate shunt activity, and antioxidative defense system. *Eur J Entomol* 101(3):459–466.

- Staples, J.F. and Buck, L.T. (2009) Matching cellular metabolic supply and demand in energy-stressed animals. *Comp Biochem Physiol A* 153:95–105.
- Stetler, R.A., Gan, Y., Zhang, W., Lion, K.A., Gao, Y., Cao, G. and Chen, J. (2010) Heat shock proteins: Cellular and molecular mechanisms in the central nervous system. *Prog. Neurobiol* 92:184–211.
- Stojanović, D. V. (2012) Taksonomsko-faunistička studija leptira (Insecta: Lepidoptera) Fruške gore. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet, Beograd, 1-622.
- Storey, K.B. (2004) Strategies for exploration of freeze responsive gene expression: advances in vertebrate freeze tolerance. *Cryobiol* 48(2):134–145.
- Storey, K.B. (2006) Reptile freeze tolerance: metabolism and gene expression. *Cryobiol* 52(1):1–16.
- Storey, K.B. (2007) Anoxic tolerance in turtles: metabolic regulation and gene expression. *J Comp Biochem Phys A* 147:263–276.
- Storey, K.B., Lant, B., Anozie, O.O. and Storey, J.M. (2013) Metabolic mechanisms for anoxia tolerance and freezing survival in the intertidal gastropod, *Littorina littorea*. *Comp Biochem Physiol A* 165(4):448–59.
- Storey, J.M. and Storey, K.B. (1985) Freezing and cellular metabolism in the gall fly larva, *Eurosta solidaginis*. *J Comp Physiol B* 155:333–337.
- Storey, K.B. and Storey, J.M. (1988) Freeze tolerance in animals. *Physiol Rev* 68, 27–84.
- Storey, K.B. and Storey, J.M. (1991) Biochemistry of cryoprotectants In: *Insects at low temperature* (eds. Denlinger D. R). New York, Jr. Chapman and Hall, pp. 64–93.
- Storey, K.B. and Storey, J.M. (2004) Metabolic rate depression in animals: transcriptional and translational controls. *Biol Rev Camb Philos Soc* 79:207–233.



Storey, K.B. and Storey, J.M. (2010) Oxygen: stress and adaptation in cold hardy insects. In *Low temperature biology of insects*. Edited by D.L. Denlinger and R.E. Lee, Jr. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 141–165.

Storey, K.B. and Storey, J.M. (2012) Insect cold hardiness: metabolic, gene and protein adaptation. *Can J Zool* 90:456–470.

Storey, K.B. and Storey, J.M. (2013) Molecular Biology of Freezing Tolerance. *Compreh Physiol* 3(3):1283–1308.

Szabóky, C., Kun, A. and Buschmann, F. (2002) Checklist of the fauna of Hungary. Vol. 2. Microlepidoptera. Hungarian Natural History Museum, Budapest, 1-184.

Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman, A.M. and Samali, A. (2006) Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO reports* 7:880–885.

## T

Tachibana, S., Numata, H. and Goto, S.G. (2005) Gene expression of heat-shock proteins (Hsp23, Hsp70 and Hsp90) during and after larval diapause in the blow fly *Lucilia sericata*. *J Insect Physiol* 51:641–647.

Taipale, M., Jarosz, D.F. and Lindquist, S. (2010) Hsp90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nature Rev Mol Cell Biol* 11:515–528.

Tait, S.W. and Green, D.R. (2010) Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(9):621–32.

Takahashi, Y., Ogra, Y. and Suzuki, K.T. (2005) Nuclear trafficking of metallothionein requires oxidation of a cytosolic partner. *J Cell Physiol* 202: 563–569.

Takayama, S., Reed, J.C. and Homma, S. (2003) Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene* 22:9041–9047.

- Tammariello, S.P. and Denlinger, D.L. (1998) G0/G1 cell arrest in the brain of *Sarcophaga crassipalpis* during pupal diapause and the expression pattern of the proliferating cell nuclear antigen. *Insect Biochem Mol Biol* 28:83–89.
- Tarrant, A.M., Baumgartner, M.F., Verslycke, T. and Johnson, C.L. (2008) Differential gene expression in diapausing and active *Calanus finmarchicus* (Copepoda). *Marine Ecol Progr Ser* 355:193–207.
- Taški, J.K., Stanić, Đ.B. and Grubor-Lajšić, G. (2004) The presence of an arylphorin-type storage protein at different life stages of *Ostrinia nubilalis* – Lepidoptera: Pyralidae. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke* 106:5–13.
- Tauber, M.J. and Tauber, C.A. (2002) Prolonged dormancy in *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae): A ten-year field study with implications for crop rotation. *Environ Entomol* 31:499–504.
- Teets, N.M., Kawarasaki, Y., Lee, R.E.J. and Denlinger, D. (2012) Expression of genes involved in energy mobilization and osmoprotectant synthesis during thermal and dehydration stress in the Antarctic midge, *Belgica antarctica*. *J Comp Biol B* 183(2):189–201.
- Theil, E.C. (2007) Coordinating responses to iron and oxygen stress with DNA and mRNA promoters: the ferritin story. *BioMetals* 20:513–521.
- Theiss A., Idell R., Srinivasan S., Klapproth J., Jones D., Merlin D. and Sitaraman S. (2007) Prohibitin protects against oxidative stress in intestinal epithelial cells. *FASEB J* 21:197–206.
- Thomas, H.E. and Lengyel, J.A. (1986) Ecdysteroid-regulated heat-shock gene expression during *Drosophila melanogaster* development. *Develop Biol* 115: 434–438.
- Tong, W.H. and Rouault, T.A. (2007) Metabolic regulation of citrate and iron by aconitases: role of iron-sulfur cluster biogenesis. *Biomaterials* 20(3–4):549–564.
- Topisirović, L.J. (2001) Dinamička biohemija. Biološki fakultet, Beograd. str. 5–9.

Tsumuki, H. and Kanehisa, K. (1978) Carbohydrate content and oxygen uptake in larvae of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker. *Berichte des Ohara Instituts für landwirtschaftliche Biologie*, Okayama Universität 17:95–110.

Tungjitwitayakul, J., Tatun, N., Singtripop, T. and Sakurai, S. (2008) Characteristic expression of three heat shock-responsive genes during larval diapause in the bamboo borer *Omphisa fuscidentalis*. *Zoolog Sci* 25(3):321–33.

## U

Uno, T., Nakasuji, A., Shimoda, M. and Aizono, Y. (2004) Expression of cytochrome c oxidase subunit 1 gene in the brain at an early stage in the termination of pupal diapause in the sweet potato hornworm, *Agrius convolvuli*. *J Insect Physiol* 50(1):35–42.

## V

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M. and Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J BiochemCell Biol* 34:114–121.

van Breukelen, F., Maier, R. and Hand, S.C. (2000) Depression of nuclear transcription and extension of mRNA half-life under anoxia in *Artemia franciscana* embryos. *J Exp Biol* 203 (Pt7):1123–30.

Vander Heiden, M.G., Plas, D.R., Rathmell, J.C., Fox, C.J., Harris, M.H. and Thompson, C.B. (2001) Growth Factors Can Influence Cell Growth and Survival through Effects on Glucose Metabolism. *Mol Cell Biol* 21(17):5899–912.

Vernooy, S.Y., Copeland, J., Ghaboosi, N., Griffin, E.E., Yoo, S.J. and Hay, B.A. (2000) Cell death regulation in *Drosophila*: Conservation of mechanism and unique insights. *J Cell Biol* 150:f69–f75.

Vukašinović, E.L., Pond, D.W., Worland, M.R., Kojić D., Purać J., Blagojević, D.P. and Grubor-Lajšić G. (2013) Diapause induces changes in the composition and biophysical properties of lipids in larvae of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Comp Biochem Physiol B* 165(4):219–225.

## W

Walden, W.E., Selezneva, A.I., Dupuy, J., Volbeda, A., Fontecilla-Camps, J.C., Theil, E.C. and Volz, K. (2006) Structure of dual function iron regulatory protein 1 complexed with ferritin IRE-RNA. *Science* 314(5807):1903–1908.

Wang, X. and Proud, C.G. (2009) Nutrient control of TORC1, a cell-cycle regulator. *Trends Cell Biol* 19(6):260–267.

Watanabe, M. (2006) Anhydrobiosis in invertebrates. *App Entomol Zool* 41 (1): 15–31.

Welch, J.W. (2009) Heat shock proteins and the cellular stress response. Dostupno na sajt: <http://www.seoulin.co.kr/dm/catalogue/assaydesign/hsp/flier-heat-shock.pdf>

Williams, C.M. (1952) Physiology of insect diapause. IV. The brain and prothoracic glands as an endocrine system in the cercopia silkworm. *Biol Bull* 103:120–138.

Wipking, W., Viebahn, M. and Neumann, D., (1995) O<sub>2</sub> consumption, water, lipid and glycogen content of early and late diapause and non-diapause larvae of the burnet moth *Zygaena trifolii*. *J Insect Physiol* 41:47–56.

Wolschin, F. and Gadau, J. (2009) Deciphering proteomic signatures of early diapause in *Nasonia*. *PLoS One* 4(7):e6394.

Worland, M.R (1996) The relationship between water content and cold tolerance in the arctic collembolan *Onychiurus arcticus* (Collembola: Onychiuridae). *Eur J Entom* 93(3):341–348.

**X**

Xu, W.H., Lu, Y.X. and Denlinger, D.L. (2012) Cross-talk between the fat body and brain regulates insect developmental arrest. *PNAS* 109(36):14687–14692.

**Y**

Yamaguchi, A., Tanaka, S., Yamaguchi, S., Kuwahara, H., Takamura, C., Imajoh-Ohmi, S., Horikawa, D.D., Toyoda, A., Katayama, T., Arakawa, K., Fujiyama, A., Kubo, T. and Kunieda, T. (2012) Two novel heat-soluble protein families abundantly expressed in an anhydrobiotic tardigrade. *PLoS One* 7(8):e44209.

Yamashita, O. (1996) Diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*: structure, gene expression and function. *J Insect Physiol* 42:669–679.

Yao, P., Chen, X., Yan, Y., Liu, F., Zhang, Y., Guo, X. and Xu, B. (2014) Glutaredoxin 1, glutaredoxin 2, thioredoxin 1, and thioredoxin peroxidase 3 play important roles in antioxidant defense in *Apis cerana cerana*. *Free Radic Biol Med* 68:335–46.

Yang, J., Zhu, J. and Xu, W.H. (2010) Differential expression, phosphorylation of COX subunit 1 and COX activity during diapause phase in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *J Insect Physiol* 56(12):1992–1998.

Yi, S.X., Yin, C.M. and Nordin, J.H. (1987) The *in vitro* biosynthesis and secretion of glycerol by larval fat bodies of chilled *Ostrinia nubilalis*. *J Insect Physiol*. 33(7):523–528.

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.

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., Kemp, W.P., Bosch, J. and Knoblett, J.N. (2005) Temporal variation in overwintering gene expression and respiration in the solitary bee *Megachile rotundata*. *J Insect Physio.* 51:621–629.

Yoshida, T., Nakamura, H., Masutani, H. and Yodoi, J. (2005) The involvement of thioredoxin and thioredoxin binding protein-2 on cellular proliferation and aging process. *Ann NY. Acad. Sci* 1055:1–12.

You, Y., Kim, J., Raizen, D. M., Avery, L. (2008) Insulin, cGMP, and TGF- $\beta$  Signals Regulate Food Intake and Quiescence in *C. elegans*: A Model for Satiety. *Cell Metab* 7(3):249–257.

Yuneva, M., Zamboni, N., Oefner, P., Sachidanandam, R. and Lazebnik, Y. (2007) Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *J Cell Biol* 178(1):93–105.

## Z

Zhang, Q. and Denlinger, D.L. (2010) Molecular characterization of heat shock protein 90, 70 and 70 cognate cDNAs and their expression patterns during thermal stress and pupal diapause in the corn earworm. *J Insect Physiol* 56(2):138–150.

Zhao, G., Bou-Abdallah, F., Arosio, P., Levi, S., Janus-Chandler, C. and Chasteen, N.D. (2003) Multiple pathways for mineral core formation in mammalian apoferritin. The role of hydrogen peroxide, *Biochem* 42:3142–3150.

Zhou, G., Kohlhepp, P., Geiser, D.L., Frasniquillo, M.D., Vazquez-Moreno, L. and Winzerling, J.J. (2007) Fate of blood meal iron in mosquitoes. *J Insect Physiol* 53:1169–1178.

Zhu, X., Dai, J., Xin Tan, Zhao, Y. and Yang, W. (2009) Activation of an AMP-activated protein kinase is involved in postdiapause development of *Artemia franciscana* encysted embryos. *BMC Devel Biol* 9:21.

## **8. PRILOZI**

**Tabela 30.** Parovi početnica korišćenih u Q-PCR analizi ekspresije gena.

Gen	Pristupni kôd (Genbank)	Prajmer	Sekvenca (5'-3')	Dužina (bp)
1. Aktin	EL928709.1	On_actin_F	CAGAAGGAAATCACAGCTCTAGCC	24
		On_actin_R	ATCGTACTCCTGTTTCGAGATCCA	24
2. Ribozomalni protein s03	EL929086.1	On_rps3_F	GTCGCAGAATTCGTGAACTAACCT	24
		On_rps3_R	ATGATGAACCTCAGCACACCATAG	24
3. NADH dehidrogenaza 1	AF349037.1	On_Nadh1_F	CGGGCAGTAGCTCAAAC TATTTTCAT	25
		On_Nadh1_R	GAAACTAATTCCTCTCTCACCTTCAGCA	27
4. KoQ-citoh. c oksidoreduktaza	EL928629.1	On_ubiq_CytC_F	GTCTCTTGCGTCTTCAGGATTAACA	25
		On_ubiq_CytC_R	CTCTTCGAATATGGCTGTGGTATTG	25
5. Citohrom c oksidaza	EU128659.1	On_CO1_F	TTAGGGCTAGCTGGTATACCTCGAC	25
		On_CO1_R	TGAATGTTCTGCTGGTGGTAGATTT	25
6. ATP sintaza gama	EL929482.1	On_ATPsyn_F	GTTAACAACCAGCAGAACCGTAACA	25
		On_ATPsyn_R	ATACAGTTGCTTGGGCTCATCTTCT	25
7. ADP/ATP translokaza	EL928491.1	On_ANT_F	GAAGACCAGCGCTACAAAGGTATC	24
		On_ANT_R	CAGAACTGCGTCTTCTTGTCTACG	24
8. Prohibitin 2	EL930118.1	On_Ph2_F	ACAGGTCTCCTTGCTGATTAGACG	24
		On_Ph2_R	GCTTTGCTCTTCCACAACAAAAG	24
9. TNF	EL928868.1	On_TNF_F	GGACCAATATTCAGGAGAGAAATCC	25
		On_TNF_R	GTCTTGGTGGTCGACTTATGTTTGA	25
10. Bax inhibitor-1	EL929324.1	On_BAXinh_F	GTTTACGGAACACTGATGATGACTTG	26
		On_BAXinh_R	GATCCACAACACTGACATACTCCATC	26
11. Tioredoksin-2	EL929289.1	On_Trx_F	AAGCTCAGAAACACCATCCTCAAG	24
		On_Trx_R	GCTTTGGGTGTCACGAACTATGAC	24

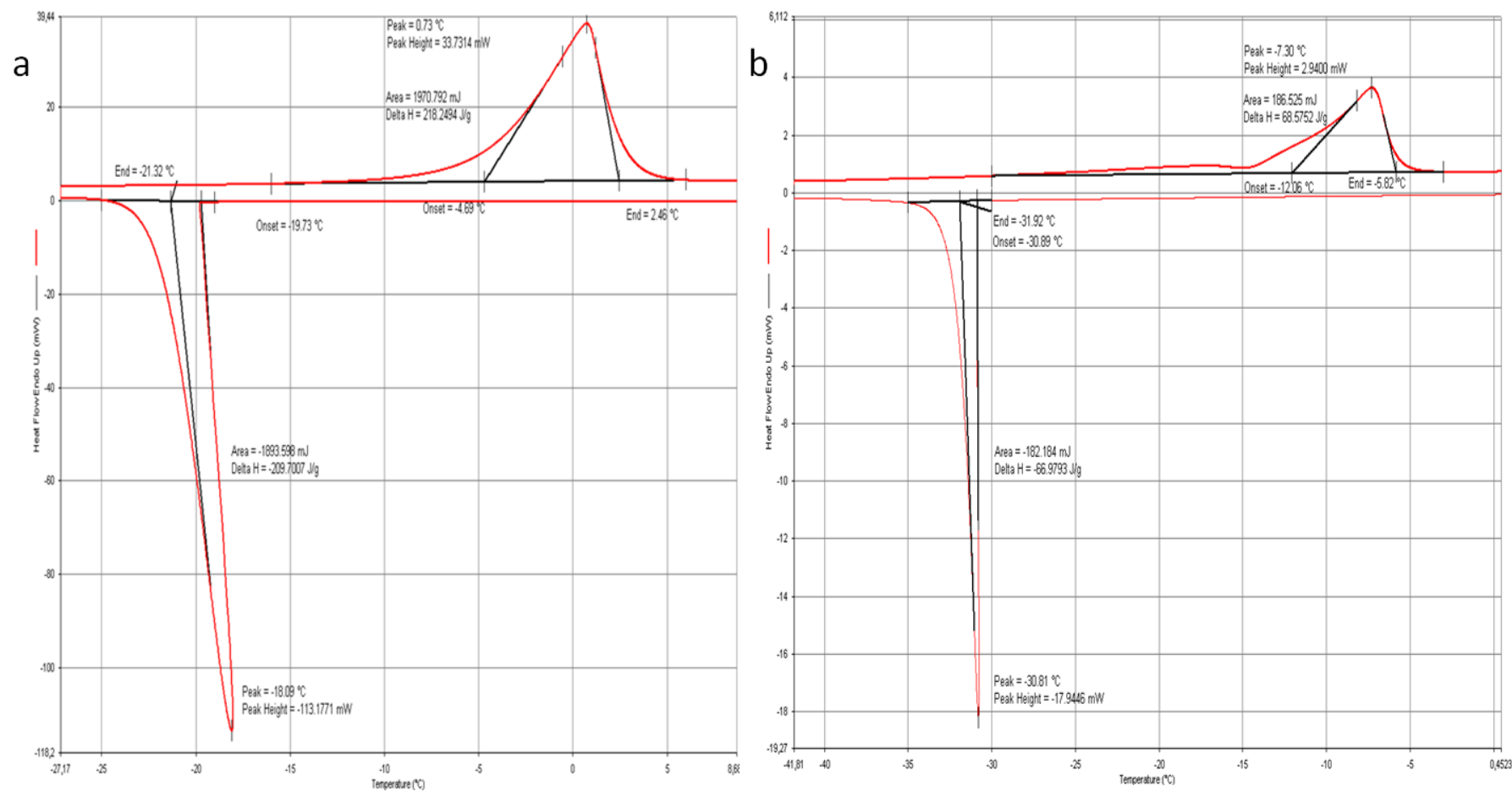


12. Glutaredoksin	EL930102.1	On_Grx_F	CCAATCAAAGTTTACGAACTTGACG	25
		On_Grx_R	GATCTTAAGCTTTTGGCTGGATTGT	25
13. Glutation S-transferaza	EL929278.1	On_GST_F	ACTTCTCAAGATTTCGAGAAAGAGCTG	26
		On_GST_R	TCAGACAGTGTACTCGTATGGCTTTC	26
14. Feritin	EL929400.1	On_Fer_F	GGCGCTCACTTCTCTAAGGATACTG	25
		On_Fer_R	GATTAGTGAGGTGACGTCAGAGGTG	25
15. Metalotionein 3	EL929052.1	On_Mtn_F	AAAGAGACACAGCTCCTCCAAATTC	25
		On_Mtn_R	ATTGAGACACAGCCACTTCATCTTC	25
16. Hsp20.1	AB568468.1	On_Hsp20.1_F	CAGCGCTAAAGAATGAAAGGTCTGT	25
		On_Hsp20.1_R	TAGGTATCTCTCATTTTCGCCTGTCC	25
17. Hsp20.4	AB568467.1	On_Hsp20.4_F	CGAAGAAAGTATCAGACGTGTCCAA	25
		On_Hsp20.4_R	TAAATGCAACGCATCACGAGATTAC	25
18. Hsc70	EL928755.1	On_Hsc70_F	GAGGCGGAAGATTACAAGAAACAAA	25
		On_Hsc70_R	GAGATCACATTTTGCTTCAATCACG	25
19. Hsp90	EL929806.1	On_Hsp90_F	CAAGATCGTTCTTCACATCAAGGAG	25
		On_Hsp90_R	CGTCCTCTTTCTTCTTCTTCTCAGC	25

**Tabela 31.** Rezultati sa diferencijalne skenirajuće kalorimetrije i osmometra. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (N=5 ili 10\*). Statistička značajnost među grupama je analizirana jednofaktorskom ANOVA analizom i *post hoc* Bonferonijevim testom za nivo značajnosti  $p < 0,05$ .

Tkivo	parametar	ND	PD	D2t	D2	D4	D6
Celo telo	%TBW	66,61 $\pm$ 1,34	65,98 $\pm$ 1,62	44,93 $\pm$ 1,00	55,61 $\pm$ 0,88	49,89 $\pm$ 1,50	49,17 $\pm$ 0,97
	Ukupna voda	4,55 $\pm$ 0,28	5,78 $\pm$ 1,01	1,67 $\pm$ 0,12	2,14 $\pm$ 0,25	2,82 $\pm$ 0,24	1,31 $\pm$ 0,19
Hemolimfa	OA	4,11 $\pm$ 0,33	3,78 $\pm$ 0,69	0,99 $\pm$ 0,05	1,22 $\pm$ 0,17	1,41 $\pm$ 0,08	0,77 $\pm$ 0,16
	OI	0,44 $\pm$ 0,08	2,00 $\pm$ 0,32	0,68 $\pm$ 0,09	0,92 $\pm$ 0,10	1,41 $\pm$ 0,22	0,53 $\pm$ 0,07
	OA/OI	11,36 $\pm$ 2,78	1,87 $\pm$ 0,04	1,59 $\pm$ 0,27	1,33 $\pm$ 0,15	1,10 $\pm$ 0,17	1,55 $\pm$ 0,45
	SCP	-23,34 $\pm$ 1,06	-22,21 $\pm$ 1,28	-24,04 $\pm$ 1,13	-24,12 $\pm$ 1,32	-28,59 $\pm$ 1,07	-28,02 $\pm$ 0,75
	Osmolalnost*	346 $\pm$ 17	353 $\pm$ 11	530 $\pm$ 35	505 $\pm$ 12	1579 $\pm$ 65	1076 $\pm$ 88
	Ukupna voda	3,28 $\pm$ 0,26	3,25 $\pm$ 0,82	2,12 $\pm$ 0,21	2,78 $\pm$ 0,25	2,16 $\pm$ 0,19	1,75 $\pm$ 0,27
Svilene žlezde	OA	2,16 $\pm$ 0,36	1,94 $\pm$ 0,43	1,18 $\pm$ 0,14	1,44 $\pm$ 0,19	1,05 $\pm$ 0,15	0,76 $\pm$ 0,15
	OI	1,12 $\pm$ 0,14	1,31 $\pm$ 0,39	0,94 $\pm$ 0,08	1,34 $\pm$ 0,07	1,12 $\pm$ 0,09	0,99 $\pm$ 0,13
	OA/OI	2,32 $\pm$ 0,79	1,58 $\pm$ 0,14	1,25 $\pm$ 0,09	1,07 $\pm$ 0,12	0,95 $\pm$ 0,13	0,74 $\pm$ 0,11
	SCP	-24,55 $\pm$ 0,71	-23,78 $\pm$ 1,12	-24,51 $\pm$ 0,88	-25,00 $\pm$ 0,84	-31,05 $\pm$ 0,91	-30,94 $\pm$ 1,86
	Ukupna voda	0,34 $\pm$ 0,02	0,36 $\pm$ 0,06	0,29 $\pm$ 0,03	0,24 $\pm$ 0,04	0,27 $\pm$ 0,04	0,22 $\pm$ 0,02
Masno telo	OA	0,23 $\pm$ 0,02	0,18 $\pm$ 0,03	0,16 $\pm$ 0,02	0,14 $\pm$ 0,04	0,17 $\pm$ 0,04	0,12 $\pm$ 0,01
	OI	0,11 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,03	0,13 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,01
	OA/OI	2,28 $\pm$ 0,37	1,08 $\pm$ 0,12	1,31 $\pm$ 0,14	1,34 $\pm$ 0,30	1,85 $\pm$ 0,52	1,41 $\pm$ 0,30
	SCP	-22,94 $\pm$ 0,97	-22,63 $\pm$ 1,15	-23,63 $\pm$ 2,01	-27,56 $\pm$ 1,28	-29,44 $\pm$ 0,62	-30,58 $\pm$ 1,49
	Ukupna voda	3,16 $\pm$ 0,37	2,73 $\pm$ 0,10	1,56 $\pm$ 0,18	1,12 $\pm$ 0,13	2,06 $\pm$ 0,22	1,33 $\pm$ 0,20
Srednje crevo	OA	2,44 $\pm$ 0,38	1,65 $\pm$ 0,06	0,80 $\pm$ 0,14	0,48 $\pm$ 0,08	0,98 $\pm$ 0,15	0,52 $\pm$ 0,11
	OI	0,72 $\pm$ 0,17	1,09 $\pm$ 0,06	0,76 $\pm$ 0,05	0,64 $\pm$ 0,05	1,08 $\pm$ 0,09	0,81 $\pm$ 0,11
	OA/OI	4,36 $\pm$ 1,41	1,53 $\pm$ 0,07	1,04 $\pm$ 0,13	0,73 $\pm$ 0,10	0,89 $\pm$ 0,12	0,63 $\pm$ 0,09
	SCP	-20,43 $\pm$ 1,11	-21,94 $\pm$ 1,05	-23,98 $\pm$ 0,38	-28,95 $\pm$ 1,40	-28,84 $\pm$ 1,75	-29,78 $\pm$ 1,07
	Ukupna voda	1,48 $\pm$ 0,05	1,33 $\pm$ 0,11	1,02 $\pm$ 0,08	1,05 $\pm$ 0,08	0,90 $\pm$ 0,09	0,88 $\pm$ 0,11
Epididermis sa kutikulom	OA	1,29 $\pm$ 0,07	0,75 $\pm$ 0,08	0,55 $\pm$ 0,05	0,56 $\pm$ 0,07	0,52 $\pm$ 0,06	0,43 $\pm$ 0,03
	OI	0,19 $\pm$ 0,03	0,58 $\pm$ 0,05	0,46 $\pm$ 0,03	0,49 $\pm$ 0,03	0,38 $\pm$ 0,04	0,45 $\pm$ 0,10
	OA/OI	7,82 $\pm$ 1,60	1,32 $\pm$ 0,15	1,18 $\pm$ 0,06	1,15 $\pm$ 0,13	1,42 $\pm$ 0,13	1,12 $\pm$ 0,19
	SCP	-20,89 $\pm$ 1,55	-20,36 $\pm$ 0,90	-21,02 $\pm$ 0,92	-24,69 $\pm$ 1,10	-28,54 $\pm$ 0,62	-28,57 $\pm$ 0,84

Parametri: %TBW - procenat ukupne telesne vode u svežoj masi, **ukupna voda** – ukupna voda tkiva izražena po suvoj masi tkiva (mgH<sub>2</sub>O/mgDW), **OA** - osmotski aktivna voda izražena po suvoj masi tkiva (mgH<sub>2</sub>O/mgDW), **OI**- osmotski neaktivna voda izražena po suvoj masi tkiva (mgH<sub>2</sub>O/mgDW), **SCP**- tačka superhlađenja (°C), **osmolalnost** (mmol/kg).



**Slika 23.** Termalne krive hemolimfe nedijapauzirajućih (a) i dijapauzirajućih (b) larvi *O. nubilalis*.

**Tabela 32.** Sadržaj adenin nukleotida i energetske naboj u celom telu larvi *O. nubilalis*. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška dobijena za 3 nezavisna pula (5 gusenica čini jedan pul).

Grupa	koncentracija (pmol/mg FW)			ADP/ATP	AMP/ATP	E.C.
	ATP	ADP	AMP			
ND	1182 $\pm$ 32	558 $\pm$ 32	94 $\pm$ 12	0,47 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,01	0,80 $\pm$ 0,004
PD	580 $\pm$ 26	278 $\pm$ 34	175 $\pm$ 8	0,48 $\pm$ 0,04	0,30 $\pm$ 0,01	0,70 $\pm$ 0,01
D2t	217 $\pm$ 21	121 $\pm$ 5	225 $\pm$ 3	0,57 $\pm$ 0,06	1,06 $\pm$ 0,11	0,49 $\pm$ 0,02
D2	392 $\pm$ 19	206 $\pm$ 18	375 $\pm$ 17	0,52 $\pm$ 0,02	0,96 $\pm$ 0,02	0,51 $\pm$ 0,004
D4	79 $\pm$ 3	80 $\pm$ 1	139 $\pm$ 3	1,02 $\pm$ 0,05	1,77 $\pm$ 0,07	0,40 $\pm$ 0,01
D6	47 $\pm$ 2	49 $\pm$ 2	118 $\pm$ 6	1,04 $\pm$ 0,04	2,49 $\pm$ 0,10	0,34 $\pm$ 0,01

**Tabela 33.** Sadržaj pojedinih koenzima i nukleotida u celom telu larvi *O. nubilalis*. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška dobijena za 3 nezavisna pula (5 gusenica čini jedan pul).

Grupa	koncentracija (pmol/mg FW)			
	NADP <sup>+</sup>	NAD <sup>+</sup>	UMP	GMP
ND	273 $\pm$ 26	1145 $\pm$ 40	1381 $\pm$ 35	727 $\pm$ 210
PD	1718 $\pm$ 14	712 $\pm$ 16	587 $\pm$ 24	258 $\pm$ 14
D2t	268 $\pm$ 18	165 $\pm$ 8	589 $\pm$ 10	1546 $\pm$ 72
D2	906 $\pm$ 6	252 $\pm$ 28	8359 $\pm$ 212	1126 $\pm$ 27
D4	860 $\pm$ 32	209 $\pm$ 6	8264 $\pm$ 90	252 $\pm$ 19
D6	407 $\pm$ 289	421 $\pm$ 17	609 $\pm$ 15	2463 $\pm$ 124

**Tabela 34.** Specifična aktivnost COX u mitohondrijskoj frakciji celog tela larvi *O. nubilalis*. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška dobijena za 3 nezavisna pula (5 gusenica čini jedan pul).

specifična aktivnost (mmol/mg prot/min)					
ND	77,40 $\pm$ 6,12	D2t	61,14 $\pm$ 1,45	D4	8,86 $\pm$ 2,58
PD	58,72 $\pm$ 4,97	D2	38,13 $\pm$ 3,68	D6	32,59 $\pm$ 0,72

**Tabela 35.** Relativna ekspresija gena u masnom telu larvi *O. nubilalis*. Rezultati su prikazani u odnosu na kontrolu (ND=1) i izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška dobijena za 3 nezavisna pula (masno telo 5 gusenica činilo jelo je jedan pul).

	<i>Nadh1</i>	<i>KoQ-Cit. c</i> <i>reduktaza</i>	<i>Cox1</i>	ATP sint.	<i>ANT</i>	<i>Phb2</i>
ND	1,00 $\pm$ 0,07	1,00 $\pm$ 0,20	1,00 $\pm$ 0,01	1,00 $\pm$ 0,25	1,00 $\pm$ 0,05	1,00 $\pm$ 0,12
PD	0,73 $\pm$ 0,47	19,60 $\pm$ 2,09	1,08 $\pm$ 0,41	0,48 $\pm$ 0,05	1,44 $\pm$ 0,08	1,54 $\pm$ 0,08
D2t	1,11 $\pm$ 0,29	1,92 $\pm$ 0,39	1,60 $\pm$ 0,39	0,55 $\pm$ 0,09	4,36 $\pm$ 0,41	1,77 $\pm$ 0,13
D2	0,07 $\pm$ 0,00	0,37 $\pm$ 0,19	0,29 $\pm$ 0,07	0,14 $\pm$ 0,02	1,09 $\pm$ 0,04	0,93 $\pm$ 0,12
D4	0,25 $\pm$ 0,01	3,48 $\pm$ 0,24	0,79 $\pm$ 0,13	0,59 $\pm$ 0,05	1,72 $\pm$ 0,21	1,93 $\pm$ 0,19
D6	0,75 $\pm$ 0,11	11,23 $\pm$ 0,73	3,11 $\pm$ 0,69	1,19 $\pm$ 0,10	4,24 $\pm$ 1,11	5,47 $\pm$ 0,41
	<i>Hsp90</i>	<i>Hsc70</i>	<i>Hsp20.4</i>	<i>Hsp20.1</i>	<i>inhibitor</i> <i>Bax prot.</i>	<i>TNF</i>
ND	1,00 $\pm$ 0,16	1,00 $\pm$ 0,34	1,00 $\pm$ 0,28	1,00 $\pm$ 0,15	1,00 $\pm$ 0,04	1,00 $\pm$ 0,08
PD	3,01 $\pm$ 0,10	6,53 $\pm$ 2,17	5,12 $\pm$ 2,54	0,68 $\pm$ 0,10	1,15 $\pm$ 0,13	4,19 $\pm$ 1,82
D2t	6,08 $\pm$ 0,37	11,52 $\pm$ 0,81	59,49 $\pm$ 11,94	0,35 $\pm$ 0,03	0,91 $\pm$ 0,01	5,41 $\pm$ 0,39
D2	8,81 $\pm$ 0,75	2,74 $\pm$ 0,24	27,21 $\pm$ 8,34	0,51 $\pm$ 0,15	0,30 $\pm$ 0,03	1,39 $\pm$ 0,25
D4	15,24 $\pm$ 0,64	9,68 $\pm$ 0,47	32,11 $\pm$ 6,88	0,64 $\pm$ 0,15	0,75 $\pm$ 0,18	7,49 $\pm$ 0,96
D6	46,54 $\pm$ 2,04	15,81 $\pm$ 4,32	136,17 $\pm$ 27,15	4,66 $\pm$ 1,79	2,28 $\pm$ 0,24	17,82 $\pm$ 1,93
	<i>GST</i>	<i>Grx</i>	<i>Trx</i>	<i>Mtn</i>	<i>Fer</i>	
ND	1,00 $\pm$ 0,04	1,00 $\pm$ 0,04	1,00 $\pm$ 0,29	1,00 $\pm$ 0,07	1,00 $\pm$ 0,03	
PD	0,05 $\pm$ 0,01	1,92 $\pm$ 0,21	1,22 $\pm$ 0,18	0,83 $\pm$ 0,01	0,83 $\pm$ 0,22	
D2t	0,40 $\pm$ 0,18	7,78 $\pm$ 0,33	0,29 $\pm$ 0,02	1,66 $\pm$ 0,09	4,21 $\pm$ 0,46	
D2	0,03 $\pm$ 0,01	0,81 $\pm$ 0,03	146,95 $\pm$ 46,10	0,89 $\pm$ 0,33	1,34 $\pm$ 0,29	
D4	1,20 $\pm$ 0,49	1,42 $\pm$ 0,27	129,41 $\pm$ 22,56	1,53 $\pm$ 0,38	3,92 $\pm$ 0,37	
D6	3,39 $\pm$ 1,13	3,59 $\pm$ 0,84	3,43 $\pm$ 0,93	2,47 $\pm$ 0,38	10,65 $\pm$ 1,09	

**Tabela 36.** Specifična aktivnost kaspazama sličnih enzima u homogenatu lutki, larvi i larvalnim tkivima *O. nubilalis*. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost aktivnosti  $\pm$  standardna greška dobijena za 3 nezavisna pula. Rezultati jednofaktorske ANOVA analize i *post hoc* Bonferonijevog testa za nivo značajnosti  $p < 0,05$  prikazani su u tabeli.

enzim	grupa	celo telo	masno telo	epidermis sa kutikulom
kaspazi 9 slična aktivnost	P	5,57 $\pm$ 1,14	5,57 $\pm$ 1,14	5,57 $\pm$ 1,14
	ND	3,20 $\pm$ 0,78	1,37 $\pm$ 0,14	2,81 $\pm$ 0,33
	D2t	3,40 $\pm$ 0,49	2,08 $\pm$ 0,17	1,36 $\pm$ 0,06
	D2	0,53 $\pm$ 0,13	3,69 $\pm$ 0,28	1,34 $\pm$ 0,30
kaspazi 8 slična aktivnost	P	1,20 $\pm$ 0,43	1,20 $\pm$ 0,43	1,20 $\pm$ 0,43
	ND	4,08 $\pm$ 0,85	0,42 $\pm$ 0,15	3,66 $\pm$ 0,19
	D2t	0,70 $\pm$ 0,06	0,98 $\pm$ 0,26	3,72 $\pm$ 1,73
	D2	0,67 $\pm$ 0,10	1,63 $\pm$ 0,24	2,02 $\pm$ 0,13
kaspazi 3 slična aktivnost	P	39,79 $\pm$ 3,31	39,79 $\pm$ 3,31	39,79 $\pm$ 3,31
	ND	6,70 $\pm$ 0,85	7,14 $\pm$ 2,89	1,49 $\pm$ 0,45
	D2t	2,76 $\pm$ 0,50	2,59 $\pm$ 0,47	1,27 $\pm$ 0,52
	D2	0,57 $\pm$ 0,15	2,27 $\pm$ 0,21	2,02 $\pm$ 0,85

# **BIOGRAFIJA AUTORA**

Željko D. Popović rođen je 04. oktobra 1983. godine u Novom Sadu. Osnovnu školu „Stevan Divnin – Bâba“ završio je u Žablju, a potom Zrenjaninsku gimnaziju 2002. godine, kao đak generacije. Osnovne i master studije biologije završio je 2007. godine na PMF-u, Univerziteta u Novom Sadu, nakon kojih upisuje Doktorske akademske studije Molekularne biologije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

U trećem i četvrtom razredu gimnazije osvojio je I i II mesto na Republičkom takmičenju iz biologije „*Nauka mladima*“. Od 2000. do 2002. godine je bio polaznik, a potom i saradnik na seminarima programa biologije u IS „Petnica“ kod Valjeva. Tokom studija bio je pitomac *Humanitarnog fonda „Privrednik“*, stipendista *Republičke fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka, Ministarstva za nauku* Republike Srbije i opština Zrenjanin i Žabalj, a 2005. godine i dobitnik stipendije nemačke fondacije – DAAD.

Tokom doktorskih studija boravio je u inostranstvu na usavršavanjima i istraživačkom radu dve godine – 2008. u Britanskom institutu za istraživanje Antarktika u Kembridžu (British Antarctic Survey), kao stipendista fondacije *British Scholarship Trust*, i 2010/2011. u Laboratoriji za dijapauzu insekata, Biološkog centra Češke akademije nauka u Češkim Buđevovicama, kao nosilac istraživačke stipendije fondacije *International Visegrad Fund (IVF)* za projekat *Molekulska regulacija dijapauze insekata*.

Od oktobra 2006. godine učestvuje u izvođenju praktične nastave iz oblasti biohemije i molekularne biologije, a od 2009. je asistent za predmete iz oblasti Molekularne biologije na Departmanu za biologiju i ekologiju PMF-a u Novom Sadu. Autor je i koautor: više naučnih radova, saopštenja na domaćim i međunarodnim skupovima i jednog poglavlja u knjizi. Govori engleski, nemački, češki i mađarski, a samostalno uči španski, grčki, hebrejski i druge jezike.

Živi u Novom Sadu sa svojom porodicom – suprugom Vesnom, sinom Stefanom (5) i ćerkom Jelenom (1).



## Изјава о ауторству

Потписани Жељко Д. Поповић

број индекса io 070010

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Молекуларна и биохемијска основа дијапаузе кукурузног пламенца**

***Ostrinia nubilalis* (Hbn.) (Lepidoptera: Pyralidae)**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

### Потпис докторанда

У Београду, 01.09.2014.



\_\_\_\_\_

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Жељко Д. Поповић

Број индекса ю 070010

Студијски програм Молекуларна биологија, модул Мол. биологија еукариота

Наслов рада Молекуларна и биохемијска основа дијапаузе кукурузног пламенца  
*Ostrinia nubilalis* (Hbn.) (Lepidoptera: Pyralidae)

Ментор проф. др Ратко Радојичић, проф. др Гордана Грубор-Лајшић

Потписани Жељко Д. Поповић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 01.09.2014.



## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

### Молекуларна и биохемијска основа дијапаузе кукурузног пламенца

#### *Ostrinia nubilalis* (Hbn.) (Lepidoptera: Pyralidae)

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, \_\_\_\_\_ 01.09.2014. \_\_\_\_\_



1. Ауторство – Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.