

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА БИОХИМИИ, БИОТЕХНОЛОГИИ И ФАРМАКОЛОГИИ

Направление: 06.03.01 – биология

КУРСОВАЯ РАБОТА
ВЛИЯНИЕ АНГИДРОБИОЗА НА ПРОТЕОМ КЛЕТОК POLYPEDILUM
VANDERPLANKI

Работа завершена:

«___» _____ 2020 г. _____ (Ф. А. Сабитова)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

Ведущий научный сотрудник
Кандидат биологических наук

«___» _____ 2020 г. _____ (А. А. Несмелов)

Казань – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	5
1.1 Особенности ангидробиоза у <i>Polypedilum vanderplanki</i>	5
1.2 Регуляция ангидробиоза	7
1.3 Роль трегалозы в высыхании комара	8
1.4 Роль протеин-метилтрансфераз	10
1.5 Роль Белков Теплового Шока.....	11
1.6 Роль LEA-белков	13
1.7 Количественный анализ протеома	16
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	18
2.1 Получение данных	18
2.2 Статистическая обработка данных.....	18
2.3 Анализ данных	19
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	20
3.1 Разведочный анализ.	20
3.2 Основной анализ и объяснение результатов.....	22
ВЫВОДЫ	32
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	33
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	34

ВВЕДЕНИЕ

Вода – крайне важный компонент любой животной клетки. Она позволяет белкам и липидам принимать определенную форму и сохранять её для выполнения своих функций. Тем не менее, существуют организмы, способные выживать при потере воды цитоплазмой клеток до 97%. К ним относятся, например, споры бактерий и грибов, семена некоторых растений (плаунки), яйца турбеллярий, нематоды, коловратки, тихоходки, ногохвостки, цисты примитивных ракообразных, а также личинки хирономиды *Polypedilum vanderplanki*, изучению которой и посвящена данная работа.

Ангидробиоз – способность организмов выживать после тотального обезвоживания. Это частный случай криптобиоза, состояния, которое характеризуется отсутствием активности и подавлением метаболизма.

P. vanderplanki – африканский комар-звонец, найденный в Северных районах Нигерии. Его личинки обитают в лужах воды, глубиной не более 20 см. В засушливый сезон вода из этих луж испаряется, что вызывает полное обезвоживание у личинок. Тем не менее, после очередного сезона дождей личинки оживают и продолжают свой жизненный цикл.

Было проведено множество исследований геномного профиля комара. Тем не менее, чтобы получить полную картину взаимодействий на молекулярном уровне, информации об одних только генах недостаточно. Для этого необходимо изучение белкового профиля, что и было выполнено в данной работе.

Целью настоящего исследования является анализ изменений протеома клеточной культуры *P. vanderplanki* в ходе её высушивания.

Задачи:

- 1) Провести подготовку и статистическую обработку данных, полученных масс-спектрометрическим методом.
- 2) Провести анализ изменения концентрации белков, закодированных ангидробиоз-индуцированными генами *P. vanderplanki*: LEA-белков,

антиоксидантов, белков метаболизма трегалозы (TRET-1, TPS, TPP, TREN), метилтрансфераз и HSP.

- 3) Объяснить полученные результаты с точки зрения уже известных данных о молекулярных процессах в клетке и профиля экспрессии генов.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Особенности ангидробиоза у *Polypedilum vanderplanki*

Систематическое положение:

Kingdom: Animalia

Phylum: Arthropoda

Class: Insecta

Order: Diptera

Family: Chironomidae

Genus: *Polypedilum*

Species: *P. vanderplanki*

Жизненный цикл

Каждый цикл своего развития насекомое проходит за 1 месяц: 2 дня в форме яйца, 3-4 дня в форме личинки, 1-2 дня в форме куколки и оставшееся время – в виде взрослой особи. Способностью к высыханию обладают только личинки.

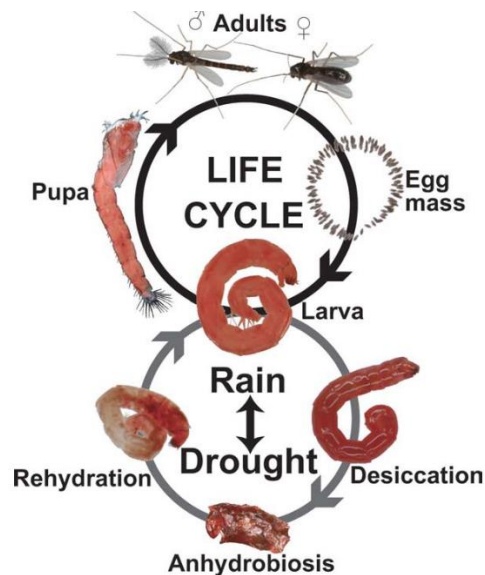


Рисунок 1 – Жизненный цикл и цикл обезвоживания-восстановления комара *P. vanderplanki*. По (Cornette и др., 2015).

P. vanderplanki – крупнейшее многоклеточное животное, способное к полному обезвоживанию с последующим возвращением к жизни после регидратации (Maleki et al., 2011). Один из их секретов его устойчивости кроется в накоплении личинками комара трегалозы – дисахарида, который играет ключевую роль в высыхании многих ангидробионтов, в частности, нематод (Madin, Crowe, 1975). Она замещает воду в клетках и служит для поддержания структуры клеточных мембран и белков. Еще одна её роль – витрификация содержимого клетки, что позволяет остановить движение молекул, не позволяя им разрушаться. Кроме того, большую роль в способности к ангидробиозу играют изменения профиля экспрессии генов, в частности тех, которые отвечают за синтез белков теплового шока, LEA- и LIL-белков, транспортеров трегалозы и антиоксидантов.

Термин «Криптобиоз» был впервые предложен Дэвидом Кэйлином в 1959 году. Тем не менее, это явление было известно довольно давно: еще Антони ван Левенгук обнаружил, что некоторые «анималькулы», которых он оставил на стекле в засушливый день, после добавления дождевой воды вновь начинают шевелиться. Об этом он написал в своем письме в 1702 году.

Первые упоминания о *P. vanderplanki* датируются 1960 годом. В своих статьях «Cryptobiosis in the larva of polypedilum vanderplanki» и «A new Chironomid from Africa the larva of which can be dehydrated without injury» Н. Е. Hinton описывает личинку комара, способного криптобиозу и впервые знакомит научный мир с этим организмом (Hinton, 1951; Hinton, 1960). Более детальное изучение комара и механизмов его адаптации к обезвоживанию началось после сбора материала в скалах Нигерии в 2000 году. После чего, в 2002 были опубликованы результаты первого исследования по высушиванию личинки (Watanabe et al., 2002).

Ангидробиоз позволяет организмам переживать не только засуху, но и другие неблагоприятные условия. Было показано, что в высушенном состоянии личинка способна выдерживать дозы гамма-излучения до 7000 Грей (Watanabe et al., 2006).

Кроме того, личинки способны выживать при крайне низких (-270°C) и высоких (106°C) температурах, которые смертельны для большинства живых

организмов (Hinton, 1960). Можно сделать вывод, что механизмы, ответственные за устойчивость к высыханию, работают схожим образом и в случае других экстремальных ситуаций, что дает устойчивость к множеству различных факторов среды.

У личинок есть и другие необычные свойства. Например, высокие концентрации солей (KCl, NaNO₃, KNO₃, Na₂SO₄, K₂SO₄, NaH₂PO₄, KH₂PO₄ и CaCl₂), не только не убивают комара, но и стимулируют у него синтез трегалозы. (Watanabe et al., 2003).

Стоит также отметить, что хирономиды показывают один из самых маленьких геномов среди насекомых (Cornette et al., 2015). Полагают, что основная причина такого небольшого размера генома – малое количество транспозонов и короткие интроны.

1.2 Регуляция ангидробиоза

P. vanderplanki – сложный многоклеточный организм, работа органов которого регулируется преимущественно нервной системой: центральной и периферической. Известно, что центральная нервная система насекомых состоит из трех частей: головного мозга, подглоточного ганглия и ганглий брюшной цепочки, расположенных в туловище. Они выполняют основную роль в регуляции жизнедеятельности организма. Было бы логичным предположить, что и в процессе ангидробиоза ключевую роль играют элементы центральной нервной системы. Тем не менее, было доказано, что даже обезглавленные личинки были способны входить в состояние ангидробиоза и успешно выходить из него (Watanabe et al., 2002). Это позволило сделать вывод о том, что мозг и подглоточный ганглий не играют существенной роли в этом процессе. В процессе дальнейших исследований выяснилось, что основная роль в высыхании принадлежит жировому телу насекомого (Watanabe et al., 2005).

Жировое тело – это рыхлая жировая ткань насекомых, расположенная преимущественно в висцеральном синусе внутренней полости тела. Основные клетки жирового тела – трофоциты. Они содержат большое количество жировых

включений, что важно для накопления энергии. Кроме того, в них активно идут метаболические процессы и накапливается гликоген, что делает похожими на печень других животных.

Как было сказано ранее, жировое тело *P. vanderplanki* – основное место синтеза трегалозы, откуда эта молекула затем транспортируется через гемолимфу в другие ткани и орган. К тому же, это единственный орган, который может переживать обезвоживание, будучи отделенным от остального тела на срок до 18 месяцев (Watanabe et al., 2005).

1.3 Роль трегалозы в высыхании комара

Трегалоза – дисахарид, образованный α -1,1-гликозидной связью между двумя молекулами α -глюкозы.

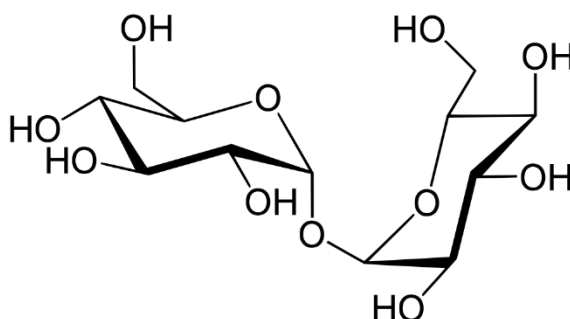


Рисунок 2 – пространственная структура трегалозы.

Результаты последних исследований показывают, что один из их секретов устойчивости *P. vanderplanki* кроется в накоплении им трегалозы, которая составляет до 20% от общей массы высушенной личинки. Эта молекула замещает воду в клетках и служит для поддержания структуры клеточных мембран и белков (Moiset и др., 2014). Кроме того, трегалоза витрифицирует содержимое клетки, останавливая движение молекул и не позволяя им разрушаться (Sakurai и др., 2008).

Другое исследование подтвердило, что успешное высыхание зависит от продолжительности высыхания. При медленном высушивании в течение 2 суток личинки накапливали в среднем 38мкл трегалозы и сохраняли жизнеспособность. Быстрое высушивание в течение 1 суток позволило личинкам набрать всего лишь

6.8 мкл трегалозы и после регидратации они не были способны вновь оживать (Kikawada и др., 2005). Это еще раз доказывает, что трегалоза выполняет ключевую роль в высыхании личинки комара.

Кроме самой трегалозы значительную роль в ангидробиозе играют белки, участвующие в её метаболизме. Рассмотрим наиболее важные из них.

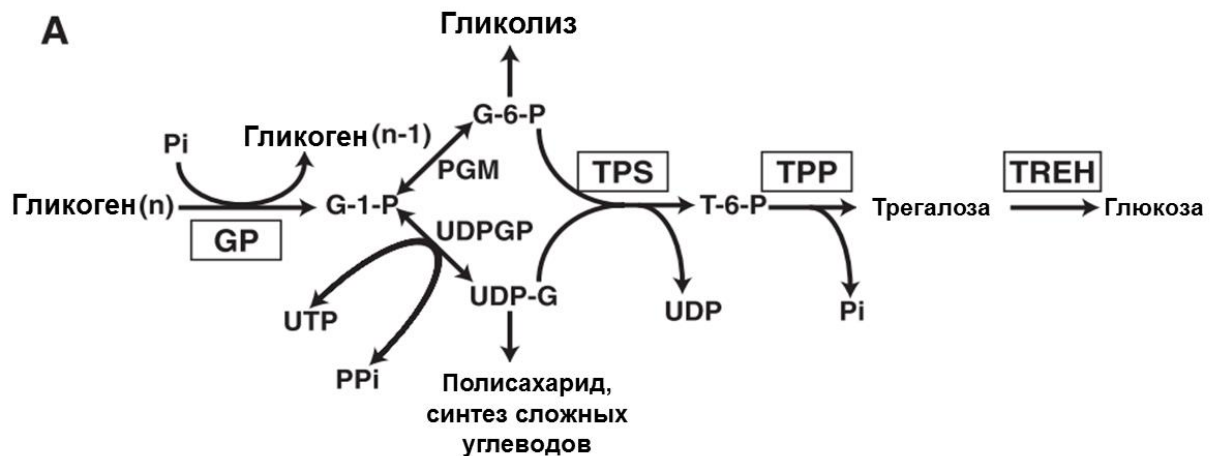


Рисунок 3 – Метаболический путь трегалозы. По (Mitsumasu и др., 2010) с изменениями.

TRET1 – транспортер трегалозы-1: мембранный белок, состоящий из 12 субмембранных структур. В норме мембраны клеток непроницаемы для трегалозы, поэтому наличие транспортера крайне важно (Kanamori et al., 2010). TRET1 обеспечивает специфический транспорт трегалозы в клетки. Экспрессия гена этого белка у *P. vanderplanki* усиливается при высушивании или при увеличении концентрации ионов внутри клетки (Kikawada et al., 2007). Специфичность этого транспортера определяется только концентрацией самой трегалозы и не зависит ни от pH, ни от электрохимического потенциала мембраны.

TREN– трегалаза: расщепляет трегалозу до глюкозы. После образования в жировом теле, по гемолимфе трегалоза транспортируется к клеткам тела, где расщепляется ферментом трегалазой для получения энергии. В случае вхождения в ангидробиоз, вместо расщепления начинает накапливаться в клетках. Была обнаружена и у других ангидробионтов. В частности, у коловратки *Adineta vaga*

(Hespeels et al., 2015), способной к ангидробиозу, экспрессия гена этого белка значительно повышалась при высыхании.

TPS – трегалозо-6-фосфат синтаза: гены TPS были найдены у многих беспозвоночных, включая нематоду *Caenorhabditis elegans*, низшее ракообразное *Aphelenchus avenae* и плодую мушку *Drosophila melanogaster*. (Mitsumasu et al., 2010). TPS участвует в классическом метаболическом пути трегалозы, синтезируя трегалозо-6-фосфат из глюкозо-6-фосфата.

TRP – трегалозо-6-фосфат фосфатаза: завершает синтез трегалозы, отщепляя фосфатную группу трегалозо-6-фосфата.

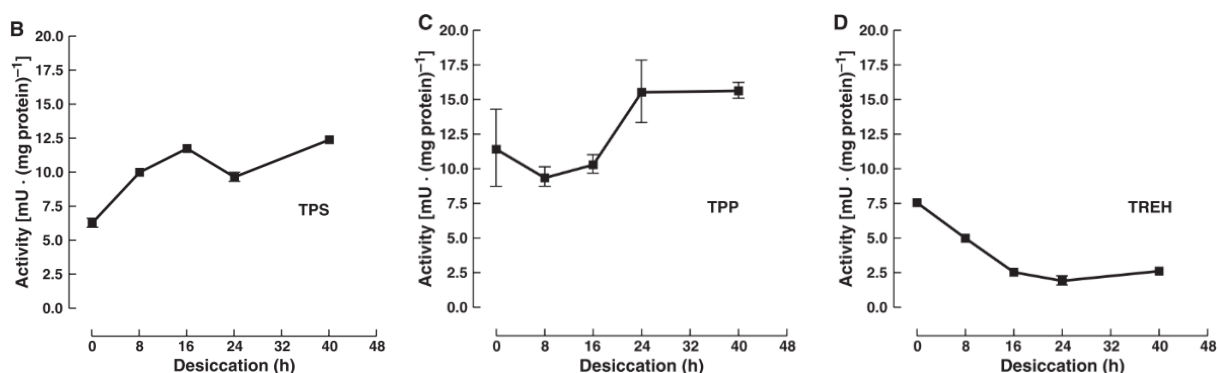


Рисунок 4 – Экспрессия генов метаболизма трегалозы при высушивании клеток *P. vanderplanki*. По (Mitsumasu и др., 2010) с изменениями.

1.4 Роль протеин-метилтрансфераз

PIMT – фермент, катализирующий восстановление поврежденных L-изоаспартил и D-изоацитильных групп. Известно, что белки подвержены множеству неферментативных посттрансляционных модификаций. Например, при действии неблагоприятных факторов или в процессе старения клетки может происходить дезаминирование L-аспарагинильных групп и изомеризация остатков L-аспартила, что меняет пространственную структуру белка и в конечном счете нарушает его функционирование. Фермент был обнаружен во многих видах эукариотических клеток (Mishra, Mahawar, 2019). Было доказано, что накопление таких изомеризованных белков приводит к различным заболеваниям, например, к нейродегенеративным (Desrosiers, Fanélu, 2011). Фермент PIMT обнаруживает

такие поврежденные белки и возвращает их структуру к исходному состоянию. Участие этого фермента в увеличение продолжительности жизни были доказано также для нематод, в частности, для *Caenorhabditis elegans* (Khare et al., 2011).

Фермент также часто встречается в семенах растений, где его накопление защищает белки от повреждения в периоды долгого хранения (Ghosh et al., 2020; Yin, Harwood, 2019).

С учетом того, что обезвоживание клетки также значительно повреждает белки, можно предположить увеличение активности этого фермента в клетках комара при обезвоживании. Действительно, в геноме *P. vanderplanki* обнаружено целых 13 паралогов этого гена, тогда как у близкородственного вида, не способного к оживанию (*P. nubifer*) вариант этого гена всего один, как и у большинства других насекомых. Экспрессия PIMT1 при высыхании в обоих видах хирономид не повышалась, тогда как гены PvPimt2–14 показывали значительное повышение уровня экспрессии при вхождении в состояние ангидробиоза (Gusev et al., 2014)

1.5 Роль Белков Теплового Шока

HSP (БТШ, белки теплового шока) – это класс функционально сходных белков, экспрессия которых усиливается при повышении температуры или при других стрессовых для клетки условиях. Кроме того, они принимают участие в сворачивании белков и их транспорте.

На данный момент известно 5 различных классов белков теплового шока: HSP33, HSP60, HSP70, HSP90, HSP100, и малые белки теплового шока (sHSPs).

При вхождении в ангидробиоз происходит денатурация и агрегация белков. Клетки различных организмов в стрессовых условиях усиливают выработку некоторых HSP для предотвращения слипания белков и возвращения их к изначальной конформации (Finka et al., 2011).

У личинки *P. vanderplanki* также наблюдается увеличенная экспрессия белков теплового шока, особенно на позднем этапе высыхания (36 часов). В этот период были обнаружены гены Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp82, и Hsp90. Кроме того, высокую экспрессию при вхождении в ангидробиоз показывали гены малых белков

теплового шока. Известно, что они формируют большие олигомерные комплексы, которые предотвращают агрегацию других белков при воздействии стрессовых ситуаций (Cornette et al., 2010).

Статья с более подробным исследованием белков теплового шока у *P. vanderplanki* была опубликована годом позже. Авторы подробно разобрали экспрессию генов БТШ, таких как *Pv-hsp90*, *Pv-hsp70*, *Pv-hsc70*, *Pv-hsp60*, *Pv-hsp20*, и *Pv-p23*, а также фактора теплового шока *Pv-hsf1* (Gusev et al., 2011). Транскрипция *Pv-hsf1*, *Pv-hsp90*, *Pv-hsp70* и *Pv-hsc70* возрастала сразу после начала высыхания и достигала своего пика на 48 часу. При возвращении к нормальному состоянию же их экспрессия значительно снижалась. Известно, что основная функция HSC70 заключается в формировании правильной конформации вновь синтезированных белков. Экспрессия гена *Pv-hsc70* значительно возрастает в первые же часы дегидратации. Учитывая тот факт, что при обезвоживании клетки экспрессия большинства белков не усиливается, а напротив, подавляется, авторы пришли к выводу, что HSC70 играет роль в сворачивании LEA белков и других молекулярных факторов, ответственных за вход в состояние ангидробиоза. Те же функции, по мнению авторов, свойственны для *Pv-hsp90* и *Pv-hsp70*.

Гены малых белков теплового шока *Pv-hsp20*, и *Pv-p23* немного отличались друг от друга паттерном экспрессии, но в целом также показывали значительное увеличение экспрессии в первые часы после начала регидратации. Оба этих белка содержат кристаллиновые домены, но отличаются своей первичной структурой. *Pv-HSP20* по строению напоминает HSP27, свойственный для дрозофилы, а *Pv-p23*, вероятно, являлся ортологом белка p26 у *Artemia franciscana*, низшего ракообразного, который также способен высыхание. Пик экспрессии *Pv-hsp20* наблюдается уже через 8 часов после начала высыхания и напоминает таковой у *Pv-hsp90*. В то же время пик *Pv-p23* приходится на конец процесса высыхания, что позволяет предположить его участие в процессах витрификации.

А *Pv-hsp60* не показывал сильных изменений в обоих состояниях, и это, возможно, доказывает его незначительную роль в ангидробиозе.

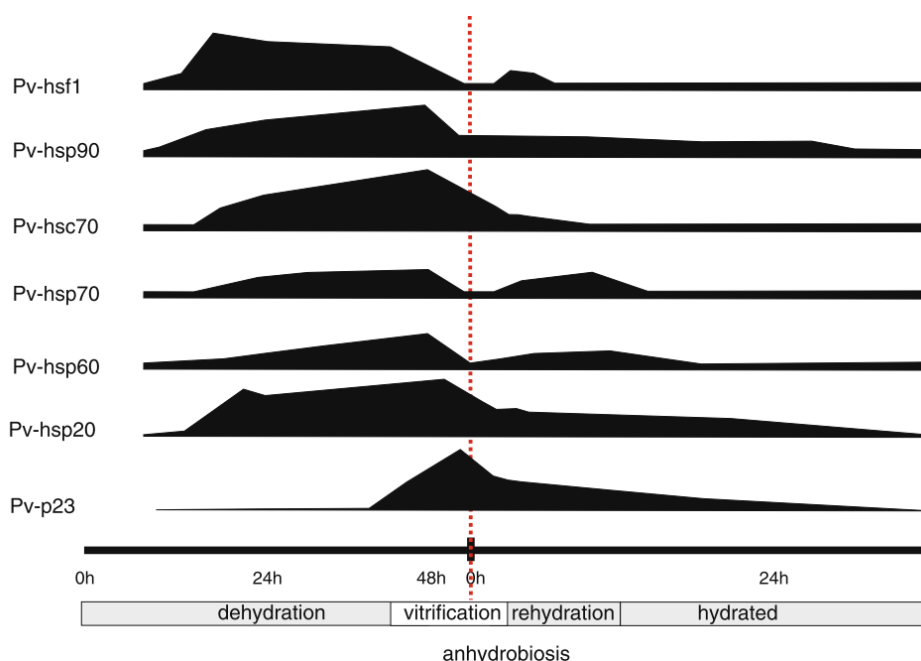


Рисунок 5 – профиль экспрессии генов *Pv-hsp* по (Gusev et al., 2011)

1.6 Роль LEA-белков

LEA (Late embryogenesis abundant) – белки позднего эмбриогенеза, идентифицированные впервые в семенах растений в фазе их созревания и высушивания. Они играют значительную роль в защите клеток от осмотического стресса, вызванного обезвоживанием.

В неактивном состоянии эти белки не имеют четкой формы, но, как только количество воды снижается, каждая молекулы LEA-белков начинают скручиваться в альфа-спираль и окружают другие белки, защищая их от слипания. Также они могут поглощать ионы, что защищает структуры клетки от осмотического стресса и участвуют в процессах витрификации (Shimizu et al., 2010).

LEA-белки в основном свойственны для растений, однако результаты последних исследований позволили обнаружить их в различных видах животных, способных переносить экстремальные потери воды (Hand et al., 2011).

В личинках *P. vanderplanki* в результате геномного анализа было выявлено 27 LEA-белков, однако все они относятся к третьей группе (G3LEA). Интересно отметить, что у *P. nubifer*, близкого к *P. vanderplanki* вида, не способного к

оживанию, не было выявлено ни одного LEA-белка, что может свидетельствовать о значительной роли этих белков в процессах ангидробиоза. (Gusev et al., 2014). В ходе qRT-PCR было выявлено, что в основном LEA-белки у *P. vanderplanki* локализованы в ядре и цитоплазме, отчасти в эндоплазматическом ретикулуме и плазматической мембране клетки (Hatanaka et al., 2015). Их концентрация значительно менялась в процессе высыхания. Согласно паттерну экспрессии их генов, исследователи разделили выявленные белки на 4 группы. Первая включает в себя гены 7 белков: *PvLea2*, *PvLea3*, *PvLea4*, *PvLea6*, *PvLea11*, *PvLea13* и *PvLea20*. Пик их экспрессии приходится на самое начало высыхания. Вторая группа – самая большая – состоит из генов 15 белков: *PvLea1*, *PvLea9*, *PvLea19*, *PvLea12*, *PvLea14*, *PvLea15*, *PvLea16*, *PvLea5*, *PvLea17*, *PvLea8*, *PvLea7*, *PvLea23*, *PvLea18*, *PvLea22*, и *PvLea26*. Их экспрессия оказывается высокой как при высыхании, так и после добавления воды. Третья группа состоит из генов 2 белков, *PvLea10* и *PvLea27*, наибольшее количество которых наблюдается сразу после начала высыхания и через 24 часа после добавления воды. Четвертая группа включала в себя 3 гена, *PvLea21*, *PvLea24* и *PvLea25*. Их экспрессия быстро снижалась по мере высыхания и сохранялась на крайне низком уровне при регидратации.

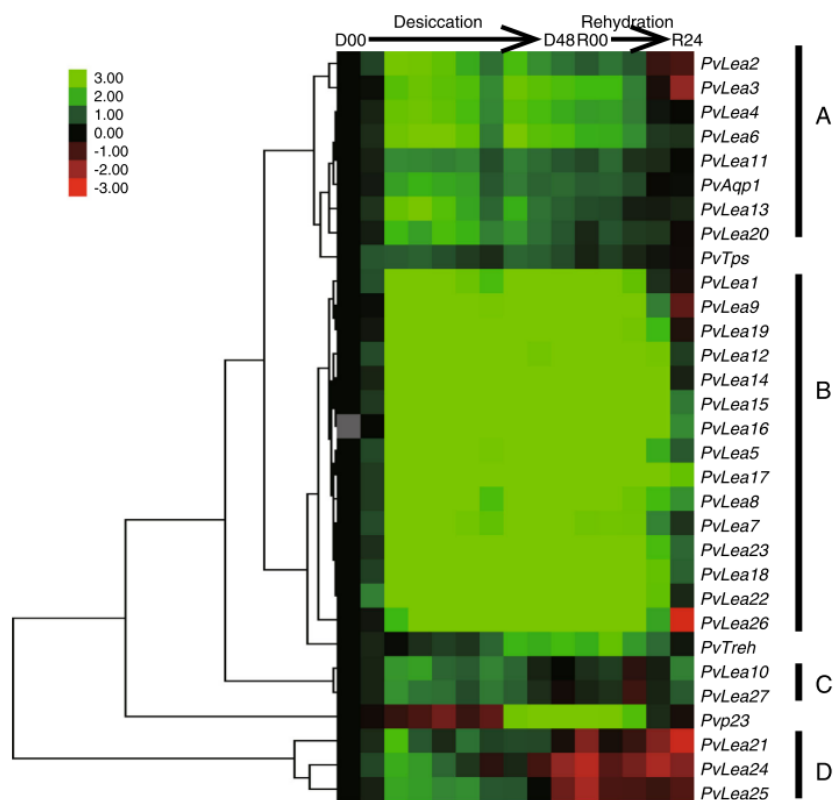


Рисунок 6 – профиль экспрессии генов *Pv-lea* по (Hatanaka et al., 2015)

1.7 Антиоксиданты и их роль в ангидробиозе

АФК – молекулы кислорода, имеющие непарный электрон на внешней орбите и обладающие высокой реакционной способностью. Они оказывают разрушающее действие на ДНК, РНК, липиды и белки. Тем не менее, именно АФК обладают бактерицидными свойствами и играют важную роль в уничтожении патогенов. Их содержание в клетке контролируется специальными факторами, которым дают собирательное название «антиоксиданты».

В среднем, только 95% поступающего в организм кислорода окисляется в митохондриях до воды. Остальная часть в результате различных реакций превращается в одну из форм АФК (Zorov et al., 2014).

Во время обезвоживания клетки АФК оказывают значительное разрушающее действие на клетку (França et al., 2007) Это происходит по разным причинам, в частности из-за того, что при сгущении цитоплазмы увеличивается её ионная силы, изменяется рН и нарушается работа антиоксидантной системы. Кроме того,

известно, что именно водная среда помогает белкам поддерживать их рабочую конформацию. Изменение этой конформации отражается на многих процессах, в том числе в работе ЭТЦ, что приводит к неполному окислению кислорода и образованию свободных радикалов.

Доказано, что именно окислительный стресс – один из самых опасных последствий недостатка воды в клетке (França et al., 2007).

Из-за этого, многие ангидробионты обладают усиленными антиоксидантными системами. Например, у объекта нашего исследования выявлено большое количество генов, ответственных за защиту клетки от окислительного стресса (Gusev et al., 2014).

1.7 Количественный анализ протеома

Протеом – совокупность всех белков организма, ткани или отдельной клетки в определённый период времени. Протеомика – область молекулярной биологии, посвящённая идентификации и количественному анализу белков.

Количественная протеомика исследует паттерны изменения количества белков в биологических образцах при действии определенных факторов или в различных состояниях и стадиях развития. Она играет крайне важную роль в понимании того, как функционируют клетки, а также используется для выявления биомаркеров различных заболеваний.

Количественный анализ протеома начинается с получения информации о количественном соотношении белков при определенных условиях при помощи масс-спектрометрии, которая позволяет однозначно идентифицировать каждый из белков. Целью такого рода исследований является сравнение экспрессии белков в норме и при действии различных факторов или при различных патологических состояниях. Определение уровня экспрессии конкретных белков (белков-маркеров) может быть использовано в диагностике онкологических, нейродегенеративных и других заболеваний (Aslam et al., 2017).

Как правило, после получения данных, проводят их статистическую обработку, а также анализ с применением специального программного обеспечения и визуализацию полученных результатов.

Статистическая обработка – незаменимая часть анализа протеомных данных (Oberberg, Vitek, 2009). Она позволяет выделить только значимые отклонения в количествах белка, которые не могли быть получены случайным образом. Для этого вычисляется *p-value*, значение которого показывает, насколько вероятно получить такое или более экстремальное значение по сравнению с наблюдаемым, при условии, что различия между образцами на самом деле нет.

R – открытое программное обеспечение, которое наиболее широко используется для статистической обработки и анализа данных. Для него создано множество дополнительных пакетов, в том числе, биоинформатических. Один из таких пакетов – BioConductor, используемый, среди прочего, для анализа геномных и протеомных данных. (Gatto, Christoforou, 2014)

Визуализация данных, как правило, служит для удобного представления результатов анализа. Для этой цели могут использоваться практически любые программы и среды, позволяющие строить графики на основе готовых данных (Oveland et al.,). В частности, это могут быть пакеты из уже упомянутого пакета BioConductor или других пакетов среды R (Gatto et al., 2015).

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Получение данных

Для исследования концентрации белков использовалась клеточная линия pv11, полученная от эмбрионов комара *P. vanderplanki* (Nakahara et al., 2010). По форме – это длинные веретенообразные клетки, свободно плавающие в клеточной среде. После обработки трегалозой по протоколу, они способны переживать высушивание в течение длительного времени. После добавления воды часть клеток возвращается к нормальному метаболическому состоянию и продолжает пролиферацию (Watanabe et al., 2016).

Высушивание клеточной культуры было выполнено после обработки клеток раствором трегалозы по опубликованному протоколу (Nakahara et al., 2010). Количественный анализ по методу tandemной масс-спектрометрии проводился после 24 часов обработки трегалозой. В качестве контроля использовались клетки, не получавшие такой обработки. Исследование было проведено в 4 повторностях.

Таким образом, на входе мы имели таблицу, содержащую название белка, его концентрацию в T0 (без обработки трегалозой) и T24 (24 часа обработки). Кроме того, с помощью сравнения с уже известными белками методом BLASTP были получены такие данные как функции и клеточная локализация некоторых белков.

Дальнейшая работа с данными требовала статистической обработки для выявления белков, которые статистически значимо меняли свою концентрацию при высушивании клеток комара.

2.2 Статистическая обработка данных

Для анализа использовался пакет «limma» в среде R. В частности, была применена функция, которая проводит t-test путем эмпирической байесовской модерации стандартных отклонений. Значения дифференциальной экспрессии при применении этого метода приведены к логарифмическому виду, что облегчает их анализ: значения ниже нуля показывают снижение концентрации, а значения выше – его повышение. За статистически достоверный результат были приняты данные с p-value ниже 0.05.

2.3 Анализ данных

Анализ данных проводился в среде R версии 3.6.0 с использованием встроенных пакетов, а также пакетов в составе Tidyverse и BioConductor. Визуализация проводилась с применением пакета ggplot2 (Gatto et al., 2015). Также для более подробного анализа и построения разведочных графиков был использован язык программирования Python версии 3.7 вместе с библиотеками matplotlib, seaborn, pandas и numpy. В качестве интерпретатора использовался Jupyter Notebook. Полученные графики были использованы лишь для планирования дальнейших шагов и не вошли в окончательное представление результатов в настоящей работе.

Для получения полной картины, исследование было разделено на две части: в первой были получены общие сведения об изменении концентрации белков, выделены наиболее отклонившиеся белки и изучены их функции. Во второй – внимание было направлено на продукты тех генов, которые в геномном анализе показывали наиболее высокую экспрессию. В частности, это были белки, имеющие критическое значение при вхождении организма в ангидробиоз и защите его структур от разрушения.

Функции белков и их локализации в клетке были получены ранее при помощи программы BLASTP по аналогии с уже известными белками у других организмов и аннотированы по базе данных семейств белковых доменов Pfam и по данным проекта Gene Ontology (GO). Однако, выяснить функции удалось не для всех белков. Белки с невыясненными функциями не вошли в настоящий анализ.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Разведочный анализ.

Разведочный анализ – важная часть любой работы над набором данных. Он позволяет выяснить объем данных и распределение значений, выявить пропущенные значения, устранить их и построить план по дальнейшему анализу. В этой части анализа было проведено изучение общей структуры данных и закономерностей изменения экспрессии белков.

Изначальный набор данных содержит информацию о белках и их количественном составе до начала высушивания (T0) и через 24 часа (T24). Всего эксперимент проведен 4 раза для каждого из вариантов для минимизирования случайных результатов. Изменение концентрации каждого отдельного белка (fold change) высчитано как среднее значение T24, деленное на среднее значение T0. . В графиках для удобства значения приведены к логарифму по основанию 2.

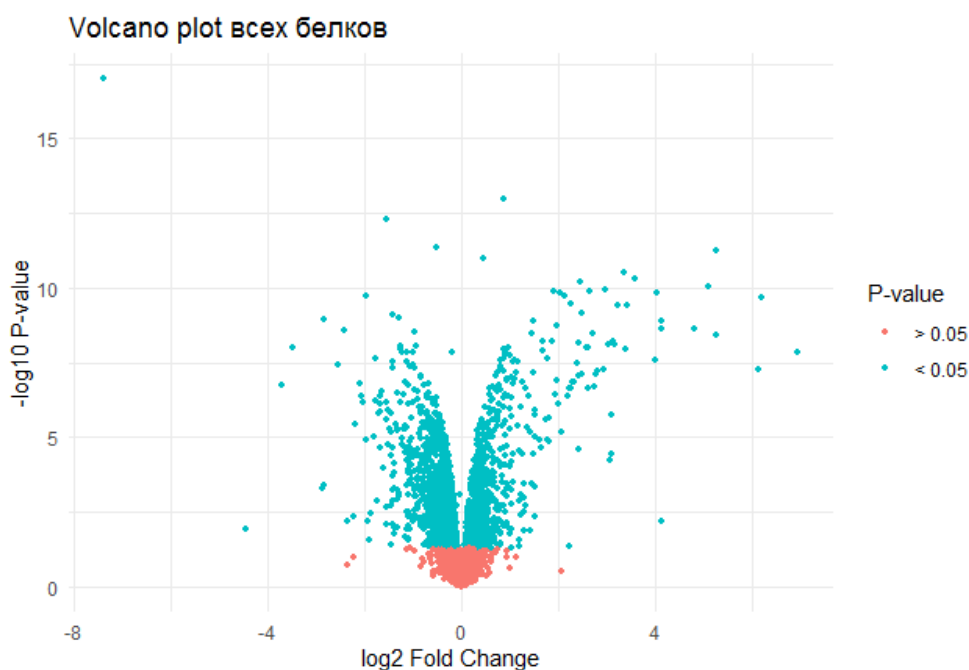


Рисунок 7 – Volcano plot всех выявленных белков

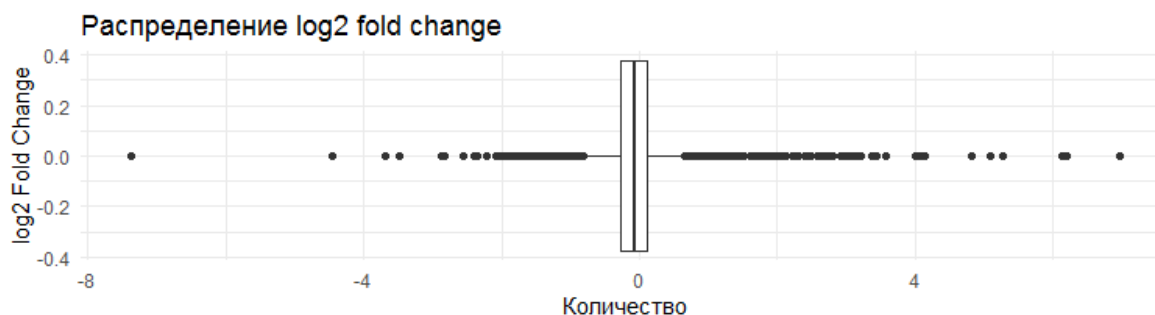


Рисунок 8 – Распределение значений \log_2 fold change всех белков.

Общее количество образцов – 4428. Разброс значений fold change от 0,006 до 124,23. Среднее значение равно 1,146, а медиана – 0,95241. Из этого можно сделать вывод, что для подавляющего большинства белков изменение концентрации было незначительным.

Количество пар нуклеотидов в гене, который кодирует каждый белок различается в пределах от 257 (Pv.06655) до 79505 (Pv.13223). Среднее значение равняется 2870,771, а медиана – 1720,5. В среднем каждому белку соответствует 9,55 пептидов (медиана – 6).

Известно, что геном *P. vanderplanki* состоит из 8 хромосом. Гаплоидный набор – 4 хромосомы. В нашем случае, большая часть всех обнаруженных образцов принадлежит белкам, закодированным в третьей хромосоме, а меньше всего их было обнаружено в четвертой. Значительных отклонений по fold change в зависимости от хромосомы выявлено не было, что можно видеть на втором графике Рисунка 9. Более широкий межквартильный размах значений в четвертой хромосоме можно объяснить меньшим количеством образцов в нем.

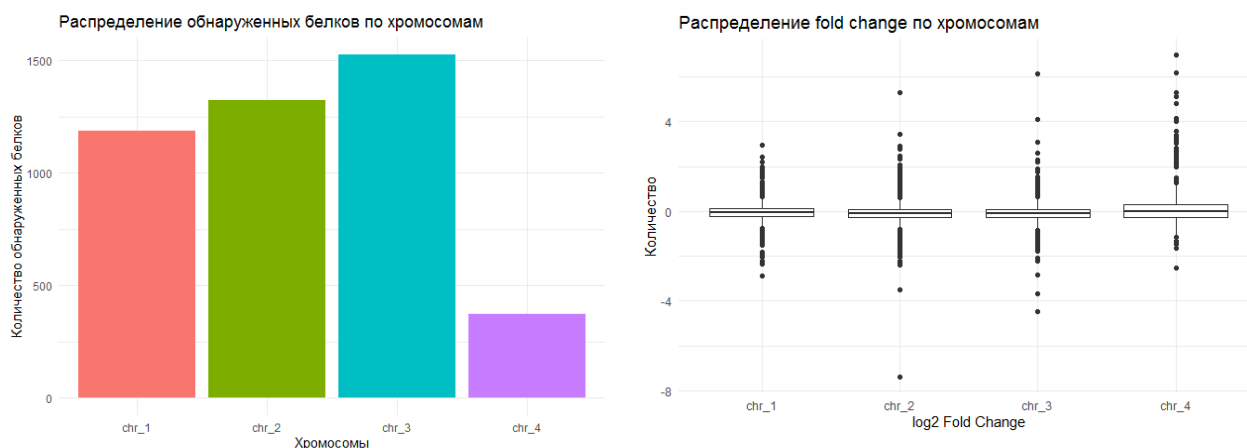


Рисунок 9 – Распределение обнаруженных белков и их fold change по хромосомам.

Белки также отличаются по локализации в клетке. Для 2265 из 4428 образцов с помощью поиска аналогий в программе BLASTP и информации из ресурса Gene ontology была получена информация о том, к какому компоненту клетки он относится. Всего был выявлен 171 вариант расположения. Наиболее часто встречались такие значения как: GO:0016021 integral component of membrane – 67 раз, GO:0005737 cytoplasm – 63 раза, GO:0005634 nucleus – 63 раза, GO:0005622 intracellular – 56 раз, GO:0016020 membrane – 51 раз, GO:0005840 ribosome – 26 раз. Из этого следует, что большая часть обнаруженных белков была частью плазматической мембраны клетки или находилась в её цитоплазме.

Также были выявлены молекулярные функции 3364 из 4428 белков. Всего – 620 уникальных функций. Для каждого отдельного белка могло быть указано несколько (до 11) различных значений. Наиболее часто встречались такие результаты как GO:0003824 catalytic activity – 110 раз, GO:0003676 nucleic acid binding – 125 раз, GO:0005524 ATP binding – 142 раза, GO:0005515 protein binding – 228 раз, GO:0005515 protein binding – 98 раз.

3.2 Основной анализ и объяснение результатов

В этом разделе будет проведен анализ ангидробиоз-индуцированных белков, упомянутых ранее.

Для получения общей картины, белки были распределены по функциям и для каждого из обозначенных функция было посчитано среднее значение изменения концентрации белков. Полученные результаты были отсортированы в порядке убывания, что позволило наглядно увидеть, белки с какими функциями максимально изменили свою концентрацию в период высушивания.

Таблица 1 – Средний log2 fold change для каждой из функций белков, отсортированный по убыванию. Первые 20 наблюдений.

	Функции белков по Interpro	Средний log2 fold change
1	IPR013766: Thioredoxin domain	6,9
2	IPR036249: Thioredoxin-like superfamily	6,9
3	IPR005746: Thioredoxin	6,2
4	IPR013766: Thioredoxin domain	6,2
5	IPR036249: Thioredoxin-like superfamily	6,2
6	IPR001436: Alpha crystallin/Heat shock protein	5,3
7	IPR002068: Alpha crystallin/Hsp20 domain	5,3
8	IPR008978: HSP20-like chaperone	5,3
9	IPR031107: Small heat shock protein HSP20	5,3
10	IPR029063: S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase	5,3
11	IPR000682: Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O- methyltransferase	4,7
12	IPR029063: S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase	4,2
13	IPR002108: Actin-depolymerising factor homology domain	4,1
14	IPR029006: ADF-H/Gelsolin-like domain superfamily	4,1
15	IPR030502: Coactosin-like protein	4,1

16	IPR013766: Thioredoxin domain	4,0
17	IPR036249: Thioredoxin-like superfamily	4,0
18	IPR000682: Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	4,0
19	IPR029063: S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase	4,0
20	IPR000682: Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	3,6

Из этой таблицы видно, что среди самые высокие fold change показывают тиоредоксины (антиоксиданты), HSP и метилтрансферазы.

1. LEA-белки

Ранее уже было сказано, что LEA – белки выполняют очень важную роль при вхождении в ангидробиоз: они предотвращают слипание белков и принимают участие в витрификации. Согласно исследованию 2015 года (Hatanaka et al., 2015), гены всех PvLEA белков показывали высокий уровень экспрессии при высыхании.

В геноме комара всего было обнаружено 27 белков этого класса, однако при анализе протеома удалось выявить только 12 из них. Можно допустить, что это связано с низкой экспрессией части белков. Среднее изменение концентрации равно 4,7 (медиана – 1,6), тогда как то же значение для всего протеома составило 1,14 (медиана – 0,95). С учетом того, что экспрессия большинства белков при

высыхании снижается, тот факт, что LEA-белки, напротив, повышают свою концентрацию, указывает на их критически важную роль в процессе высыхания.

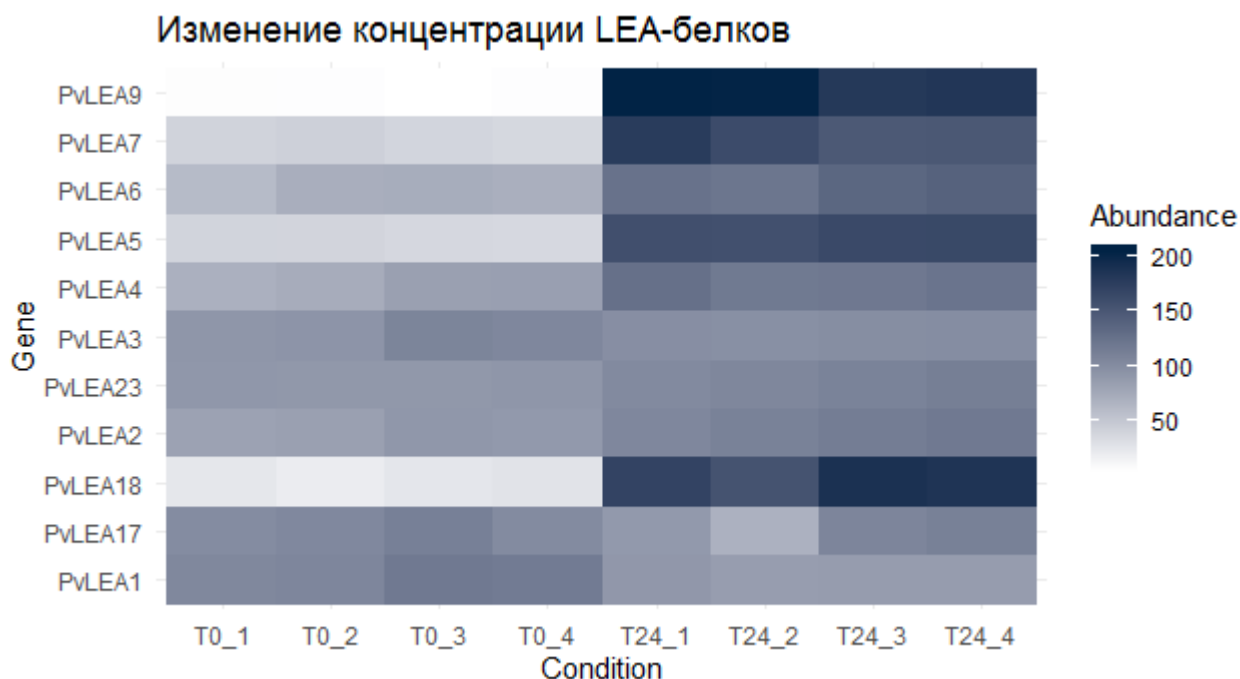


Рисунок 10 – Тепловая карта изменения концентрации LEA-белков

Как видно по рисунку 10, подавляющее большинство LEA-белков при высыхании увеличивали свою концентрацию, причем значительно. Только два из них понизили свою концентрацию: PvLEA1 и PvLEA17. Из общей картины также немного выбивается PvLEA3, однако у него отчетливо видно, что между значениями его повторностей есть ощутимая разница. То же самое мы наблюдаем и для PvLEA17. Это может указывать на то, что экспрессия этих белков в целом довольно изменчива. Что касается PvLEA1, разброс значений в его повторностях вполне допустимый. Возможно, уменьшение концентрации белка при увеличении экспрессии гена указывает на значимые факторы, такие как посттрансляционная регуляция концентрации или короткое время жизни белка.

2. Антиоксиданты

При исследовании геномного профиля *P. vanderplanki* было отмечено значительное увеличение экспрессии генов антиоксидантной системы, в частности, тиоредоксинов и супероксиддисмутазы (Gusev et al., 2014).

Настоящее исследование протеомных данных показало, что среднее изменение концентрации у антиоксидантных белков равно 11,9 (медиана – 1,56), в то время как то же значение для всего протеома составляет 1,14 (медиана – 0,95).

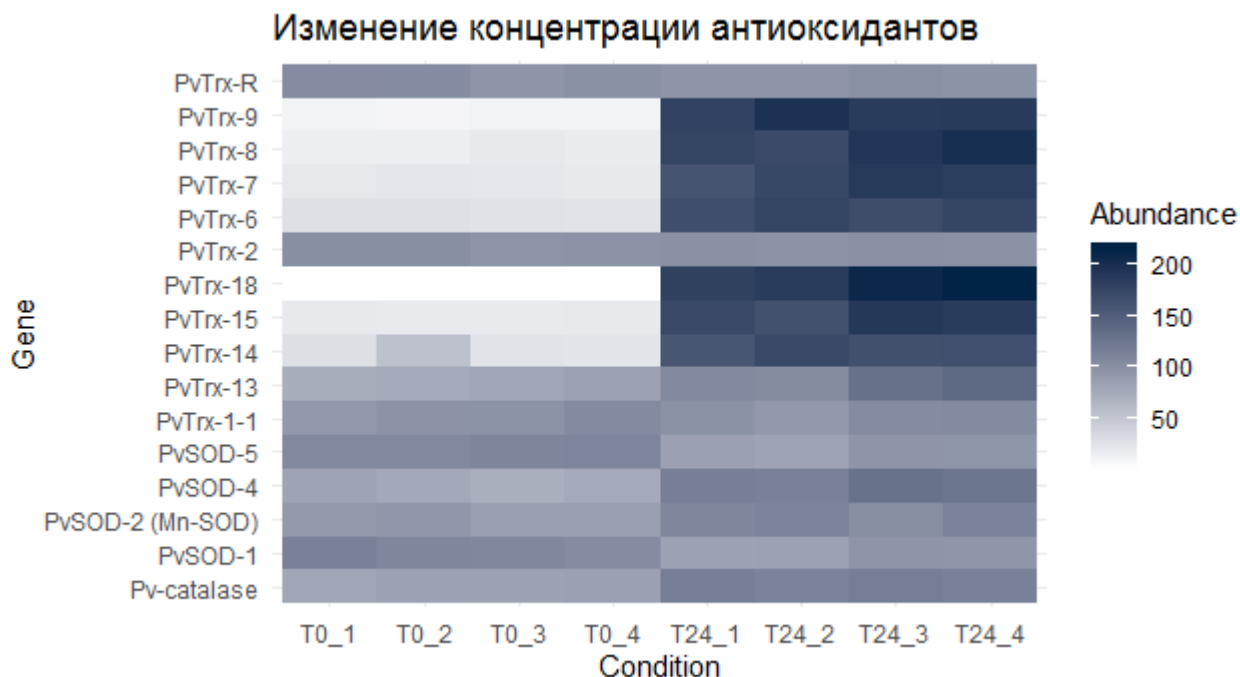


Рисунок 11 – Тепловая карта изменения концентрации антиоксидантов

Согласно результатам анализа, часть антиоксидантов значительно повысила свою концентрацию. Очевидные нарушения этого правила заметны для белков – продуктов генов PvTrx-R, PvTrx-1 и PvTrx-2. Однако можно заметить, что первая и вторая повторности контрольных образцов значительно отличаются от третьей и четвертой. Это показывает, что в целом концентрация этих белков нестабильна. Более интересно посмотреть на значения концентраций для супероксиддисмутаз. PvSOD-1 и PvSOD-5 показывали некоторое уменьшение концентрации при высушивании. Это позволяет предположить, что они, в отличие от других белков семейства супероксиддисмутаз, не выполняют ключевой роли при входе в состояние ангидробиоза.

3. Белки метаболизма и транспорта трегалозы

В этом анализе будут исследованы 4 белка, наиболее тесно связанных с метаболизмом и транспортом трегалозы: PvTPP, PvTPS, PvTREN и TRET-1.

Результаты анализа экспрессии их генов показали, что, по мере высыхания клетки, увеличивается синтез PvTPP и PvTPS, но снижается синтез PvTREN – фермента, расщепляющего трегалозу, что кажется вполне логичным (Gusev et al., 2014). Однако результаты исследования белкового профиля показали повышение концентрации белков всех упомянутых генов. Для PvTPP и PvTPS такое повышение, очевидно, коррелирует с увеличением экспрессии их генов, тогда как в случае с PvTREN можно предположить, что существует механизм подавления экспрессии генов трегалазы при высыхании, который, однако, не приводит к снижению концентрации фермента.

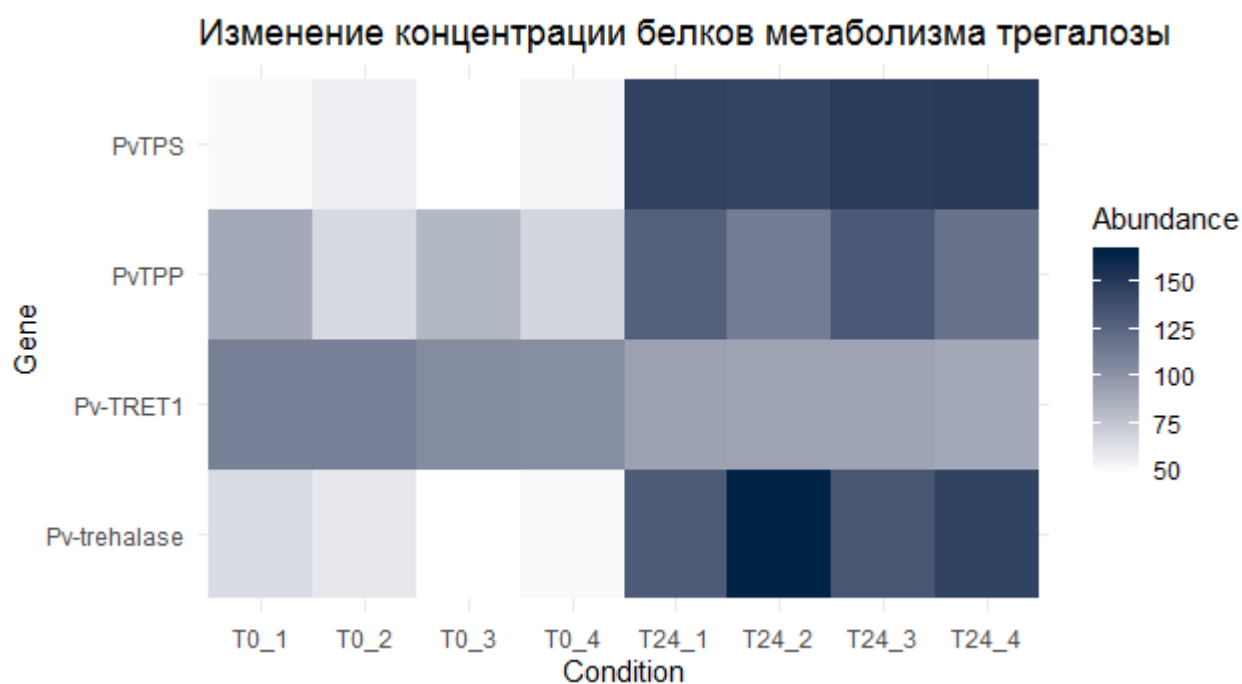


Рисунок 12 – Тепловая карта изменения концентрации белков метаболизма трегалозы.

Также значительно понижается количество белка TRET-1. Его концентрация меняется в 0,86 раз ($p\text{-value} = 4,13 \cdot 10^{-6}$). Возможно, причина кроется в самой функции этого белка. Это крайне важный транспортер, отвечающий за доставку трегалозы в клетки организма. Если учесть, что трегалоза – это дисахарид, который служит не только для вхождения в состояние ангидробиоза, но и как источник энергии и

вполне распространен среди насекомых, можно предположить, что его экспрессия должна быть высокой в фоновом режиме, а не только в период высушивания. Кроме того, регуляция транспорта трегалозы контролируется концентрацией самого вещества по обе стороны от мембраны клетки, а не увеличением и уменьшением синтеза его транспортера.

4. Протеин-метилтрансферазы

PiMP – крайне важные ферменты для поддержания ангидробиоза, так как они катализируют исправление поврежденных групп в белках и восстанавливают их функцию.

Ранее было показано, что гены метилтрансфераз PvMT2-13 при высушивании клетки значительно повышают свою экспрессию по сравнению с клетками в нормальных условиях (Gusev et al., 2014). В настоящем исследовании были получены сходные результаты и для соответствующих белков.

Из 13 ферментов в протеоме *P. vanderplanki* идентифицировано 11 из них, пропущены PvMT-6 и PvMT-8.

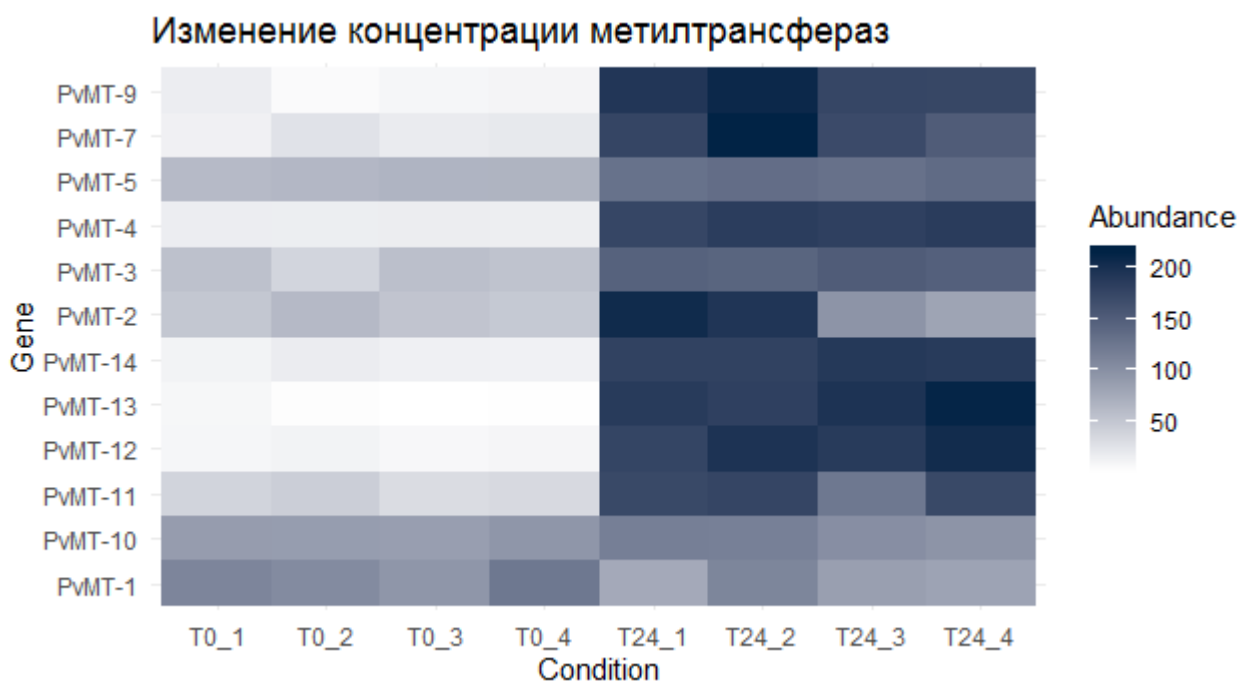


Рисунок 13 – Тепловая карта изменения концентрации метилтрансфераз.

Средний fold change у всего протеома составил 1,14 (медиана – 0,95), тогда как у метилтрансфераз это же значение оказалось равным 9,7 (медиана – 6,4). Это показывает, что в целом метилтрансферазы гораздо больше увеличивали свою концентрацию при высыхании, чем остальные белки протеома.

Оказалось, что практически все метилтрансферазы показывают значительное изменение концентрации при вхождении клетки в ангидробиоз. Исключение – PvMT-1, который не показывает значительных отличий. Ген этого белка также не показывал увеличения экспрессии при высыхании. Стоит помнить, что это консервативный ген, характерный для множества других организмов и функционирующий в нормальных условиях. Возможно, в клетках комара он также отвечает за фоновую репарацию белков, тогда как за репарацию в условиях стресса отвечают его паралоги, характерные только для *P. vanderplanki*. Этим можно объяснить отсутствие значимых изменений в экспрессии как самого гена, так и его продукта.

Другой белок, не показывающий значительных изменений - PvMT-10, однако и экспрессия соответствующего гена хоть и показывает увеличение, но гораздо менее значительное, чем у других представителей этой группы.

Таким образом, изменение концентрации изученных белков прямо пропорционально дифференциальной экспрессии их генов и легко объяснимо с точки зрения их молекулярной функции.

5. HSP – белки теплового шока

HSP – крайне важные молекулы для большинства клеток. Они защищают белки от воздействия различных стрессовых компонентов, в том числе температурных, что и дало им их название. Для *P. vanderplanki* доказана значительная роль HSP при вхождении в ангидробиоз, о чем уже было сказано ранее.

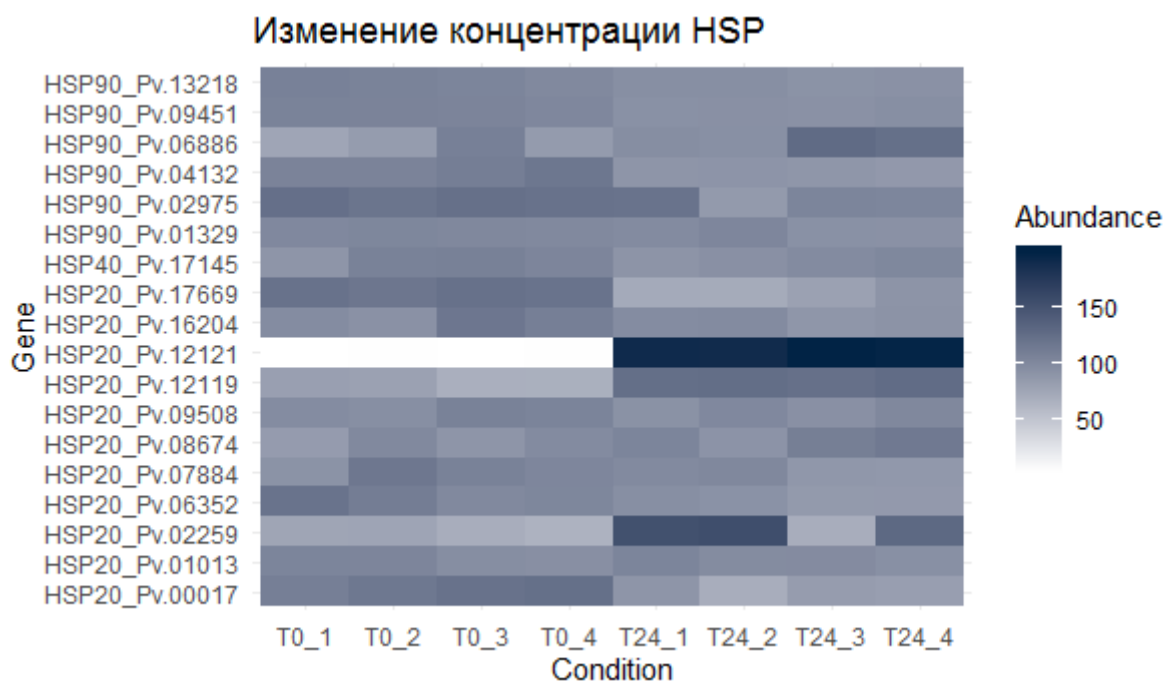


Рисунок 14 – Тепловая карта изменения концентрации HSP.

Больше всего в протеоме было обнаружено малых белков теплового шока HSP20. Также был обнаружен один белок HSP40 и 6 белков HSP90. Самое ощутимое изменение концентрации было замечено для белка HSP20 – продукта гена Pv.12121, его концентрация за период высушивания увеличилась в 38 раз. Крайне низкое содержание в нормальном состоянии дает возможность предположить, что этот белок выполняет значительную роль именно в процессах высыхания клетки. По результатам анализа в программе BLASTP была обнаружена сходная последовательность у *Belgica antarctica*, комара-звонца из семейства Chironomidae, эндемика Антарктики. Известно, что данный вид комаров способен переносить смертельное для остальных существ замораживание (Teets et al., 2020) и является родственным объекту нашего исследования.

Изучение геномного профиля *P. vanderplanki* показало значительное (до 8 раз) увеличение экспрессии Pv.12121 при обезвоживании и скорое возвращение к изначальным показателям после добавления воды.

Все эти данные позволяют предположить, что продукт гена Pv.12121 играет крайне важную роль в процессах ангидроброза и способствует сохранению клетки в экстремальных условиях.

Продукт гена Pv.02259 также показал значительное изменение концентрации при обезвоживании клетки. По результатам анализа в программе BLASTP сходных последовательностей у других организмов обнаружено не было. Это позволяет предположить, что данный белок принимает некоторое участие в процессе защиты клетки при высыхании.

Оба этих белка относятся к малым HSP, характерной структурой которых является наличие α -кристалинового домена. Считается, что белки группы HSP20 выполняют роль шаперонов в высыхающей клетки, защищая её оксидативного стресса и агрегации молекул (Gusev et al., 2011).

Для генов других HSP (в частности, HSP90) в большинстве случаев хоть и наблюдалось повышение экспрессии при обезвоживании, такого же экстремального повышения значений обнаружено не было (Gusev et al., 2014), что соответствует результатам нашего анализа.

ВЫВОДЫ

1) Проведен обзор научной литературы по тематике работы. Освоены методы сравнительного анализа протеома с помощью биоинформатических инструментов и визуализации полученных результатов.

2) Выполнен анализ изменения концентрации белков, закодированных ангидробриоз-индуцированными генами *P. vanderplanki*: LEA-белков, антиоксидантов, белков метаболизма трегалозы (TRET-1, TPS, TPP, TREN), метилтрансфераз и HSP. Для всех этих групп белков показано увеличение концентрации при высушивании.

3) На основе протеомных данных и существующей литературы по геномным данным проведено сравнение экспрессии вышеуказанных групп генов с соответствующими им белками при аналогичных условиях.

4) Среди изученных белков наименее специфичными к процессам ангидробриоза показали себя HSP – белки теплового шока. Только два представителя группы HSP20 значительно повысили свою концентрацию, а другие HSP в целом остались при тех же значениях.

Таким образом, в этой работе был проанализирован протеомный профиль клеточной культуры комара *P. vanderplanki* при вхождении в состояние ангидробриоза и проведена попытка объяснения полученных результатов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК – рибонуклеиновая кислота

ЦНС – центральная нервная система

АФК – Активные формы кислорода

ЭТЦ – электронтранспортная цепь

HSP – heat shock proteins (белки теплового шока)

LEA – late embryogenesis abundant, белок (белки) позднего эмбриогенеза

PIMT – protein-L-isoaspartate- (D-aspartate) O-methyltransferases

qRT-PCR – Quantitative real-time PCR

TREN – трегалаза

TRET1 – транспортер трегалозы-1

TRP – трегалозо-6-фосфат фосфатаза

TPS – трегалозо-6-фосфат синтаза

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- 1) Oveland E. и др. Viewing the Proteome: How to Visualize Proteomics Data? Main text Background.
- 2) Aslam B. и др. Proteomics: Technologies and their applications // J. Chromatogr. Sci. 2017. Т. 55. № 2. С. 182–196.
- 3) Cornette R. и др. Identification of anhydrobiosis-related genes from an expressed sequence tag database in the cryptobiotic midge *Polypedilum vanderplanki* (diptera; chironomidae) // J. Biol. Chem. 2010. Т. 285. № 46. С. 35889–35899.
- 4) Cornette R. и др. Chironomid Midges (Diptera, Chironomidae) Show Extremely Small Genome Sizes // Zoolog. Sci. 2015. Т. 32. № 3. С. 248–254.
- 5) Desrosiers R.R., Fanélus I. Isoaspartyl Affect Aging-Review.Pdf // 2011. С. 8–18.
- 6) Finka A., Mattoo R.U.H., Goloubinoff P. Meta-analysis of heat-and chemically upregulated chaperone genes in plant and human cells // Cell Stress Chaperones. 2011. Т. 16. № 1. С. 15–31.
- 7) França M.B., Panek A.D., Eleutherio E.C.A. Oxidative stress and its effects during dehydration // Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol. 2007. Т. 146. № 4. С. 621–631.
- 8) Gatto L. и др. Visualization of proteomics data using R and Bioconductor // Proteomics. 2015. Т. 15. № 8. С. 1375–1389.
- 9) Gatto L., Christoforou A. Using R and bioconductor for proteomics data analysis // Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics. 2014. Т. 1844. № 1 PART A. С. 42–51.
- 10) Ghosh S. и др. Arabidopsis protein L-ISOASPARTYL METHYLTRANSFERASE repairs isoaspartyl damage to antioxidant enzymes and increases heat and oxidative stress tolerance // J. Biol. Chem. 2020. Т. 295. № 3. С. 783–799.
- 11) Gusev O. и др. Expression of heat shock protein-coding genes associated with anhydrobiosis in an African chironomid *Polypedilum vanderplanki* // Cell Stress

Chaperones. 2011. Т. 16. № 1. С. 81–90.

12) Gusev O. и др. Comparative genome sequencing reveals genomic signature of extreme desiccation tolerance in the anhydrobiotic midge // Nat. Commun. 2014. Т. 5.

13) Hand S.C. и др. LEA Proteins During Water Stress: Not Just for Plants Anymore // Annu. Rev. Physiol. 2011. Т. 73. № 1. С. 115–134.

14) Hatanaka R. и др. Diversity of the expression profiles of late embryogenesis abundant (LEA) protein encoding genes in the anhydrobiotic midge *Polypedilum vanderplanki* // Planta. 2015. Т. 242. № 2. С. 451–459.

15) Hespeels B. и др. Against all odds: Trehalose-6-phosphate synthase and trehalase genes in the bdelloid rotifer *Adineta vaga* were acquired by horizontal gene transfer and are upregulated during desiccation // PLoS One. 2015. Т. 10. № 7. С. 1–23.

16) Hinton H.E. A new Chironomid from Africa, the larva of which can be dehydrated without injury // Proc. Zool. Soc. London. 1951. Т. 121. № 2. С. 371–380.

17) Hinton H.E. Cryptobiosis in the larva of *Polypedilum vanderplanki* hint. (Chironomidae). : Pergamon Press Ltd, 1960. 286–300 с.

18) Kanamori Y. и др. The trehalose transporter 1 gene sequence is conserved in insects and encodes proteins with different kinetic properties involved in trehalose import into peripheral tissues // Insect Biochem. Mol. Biol. 2010.

19) Khare S., Linster C.L., Clarke S.G. The interplay between protein L-isoaspartyl methyltransferase activity and insulin-like signaling to extend lifespan in *Caenorhabditis elegans* // PLoS One. 2011. Т. 6. № 6.

20) Kikawada T. и др. Factors Inducing Successful Anhydrobiosis in the African Chironomid *Polypedilum vanderplanki*: Significance of the Larval Tubular Nest 1. , 2005. 710–714 с.

21) Kikawada T. и др. Trehalose transporter 1, a facilitated and high-capacity trehalose transporter, allows exogenous trehalose uptake into cells // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2007. Т. 104. № 28. С. 11585–11590.

22) Madin K.A.C., Crowe J.H. Anhydrobiosis in nematodes: Carbohydrate and lipid metabolism during dehydration // J. Exp. Zool. 1975. Т. 193. № 3. С. 335–342.

23) Maleki R.N., Hasan V., Mansure S. *Polypedilum vanderplanki* (Dip:

Chironomidae), the largest Extremophlie // Clin. Biochem. 2011.

24) Mishra P.K.K., Mahawar M. PIMT-Mediated Protein Repair: Mechanism and Implications // Biochem. 2019. T. 84. № 5. C. 453–463.

25) Mitsumasu K. и др. Enzymatic control of anhydrobiosis-related accumulation of trehalose in the sleeping chironomid, *Polypedilum vanderplanki* // FEBS J. 2010. T. 277. № 20. C. 4215–4228.

26) Moiset G. и др. Disaccharides impact the lateral organization of lipid membranes // J. Am. Chem. Soc. 2014. T. 136. № 46. C. 16167–16175.

27) Nakahara Y. и др. Cells from an anhydrobiotic chironomid survive almost complete desiccation // Cryobiology. 2010. T. 60. № 2. C. 138–146.

28) Oberg A.L., Vitek O. Statistical design of quantitative mass spectrometry-based proteomic experiments // J. Proteome Res. 2009. T. 8. № 5. C. 2144–2156.

29) Sakurai M. и др. Vitriification is essential for anhydrobiosis in an African chironomid, *Polypedilum vanderplanki*. , 2008.

30) Shimizu T. и др. Desiccation-induced structuralization and glass formation of group 3 late embryogenesis abundant protein model peptides // Biochemistry. 2010. T. 49. № 6. C. 1093–1104.

31) Teets N.M. и др. Changes in energy reserves and gene expression elicited by freezing and supercooling in the antarctic midge, *Belgica antarctica* // Insects. 2020. T. 11. № 1. C. 1–14.

32) Watanabe K. и др. Air-dried cells from the anhydrobiotic insect, *Polypedilum vanderplanki*, can survive long term preservation at room temperature and retain proliferation potential after rehydration // Cryobiology. 2016. T. 73. № 1. C. 93–98.

33) Watanabe M. и др. Mechanism allowing an insect to survive complete dehydration and extreme temperatures // J. Exp. Biol. 2002. T. 205. № 18. C. 2799–2802.

34) Watanabe M. и др. Induction of anhydrobiosis in fat body tissue from an insect // J. Insect Physiol. 2005. T. 51. № 6 SPEC. ISS. C. 727–731.

35) Watanabe M. и др. Biological effects of anhydrobiosis in an African chironomid, *Polypedilum vanderplanki* on radiation tolerance // Int. J. Radiat. Biol.

2006. T. 82. № 8. C. 587–592.

36) Watanabe M., Kikawada T., Okuda T. Increase of internal ion concentration triggers trehalose synthesis associated with cryptobiosis in larvae of *Polypedilum vanderplanki* // J. Exp. Biol. 2003. T. 206. № 13. C. 2281–2286.

37) Yin L., Harwood C.S. Functional divergence of annotated L-isoaspartate O-methyltransferases in an α -proteobacterium // J. Biol. Chem. 2019. T. 294. № 8. C. 2854–2861.

38) Zorov D.B., Juhaszova M., Sollott S.J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release // Physiol. Rev. 2014. T. 94. № 3. C. 909–950.