

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 подготовки: 06.03.01 – биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
АНАЛИЗ ПРОТЕОМА КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК R. VANDERPLANKI В ХОДЕ
ИНДУКЦИИ АНГИДРОБИОЗА

Работа завершена:

«__» июня 2021 г. _____ (Ф. А. Сабитова)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель

(ст. науч. сотр., к.б.н.)

«__» июня 2021 г. _____ (А. А. Несмелов)

Зав. кафедрой

д.б.н., профессор

«__» июня 2021 г. _____ (Р. Г. Киямова)

ОГЛАВЛЕНИЕ

стр.

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1 Понятие ангидробиоза	6
1.2 Факторы успешного ангидробиоза у различных организмов.....	6
1.2.1 Ангидробиоз у бактерий	10
1.2.2 Ангидробиоз у дрожжей	12
1.2.3 Ангидробиоз у жаброногих ракообразных	13
1.2.4 Ангидробиоз у тихоходок.....	14
1.2.5 Ангидробиоз у нематод.....	16
1.3 Строение и жизненный цикл <i>P. vanderplanki</i>	17
1.3.1 Факторы ангидробиоза у <i>P. vanderplanki</i>	18
1.4 Биоинформатический анализ протеомных данных	22
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	25
2.1 Получение данных и общая характеристика протеома клеток Pv11.....	25
2.2 Язык и среда программирования.....	26
2.3 Сравнение изменения экспрессии белков с изменением экспрессии генов	27
2.4 Анализ участков хромосом с генами белков с высокой индукцией при моделировании ангидробиоза в клетках Pv11	27
2.5 Анализ функционального обогащения генов	28
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	29
3.1 Общая характеристика данных протеома клеток Pv11	29
3.2 Сравнение изменения экспрессии белков с изменением экспрессии генов	31
3.3 Анализ протеомных данных белков, закодированных ангидробиоз- ассоциированными генами <i>P. vanderplanki</i>	33
3.2.1 LEA-белки.....	33

3.2.2 Антиоксиданты.....	35
3.2.3 Белки метаболизма и транспорта трегалозы.....	36
3.2.4 Протеин-метилтрансферазы	38
3.2.5 Белки теплового шока	40
3.3 Анализ участков хромосом с генами белков с высокой индукцией при моделировании ангидробิโอ́за в клетках Pv11	42
3.4 Анализ функционального обогащения генов	42
ВЫВОДЫ	45
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	46
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	47

ВВЕДЕНИЕ

Ангидробиоз – способность организмов пережить полное обезвоживание с последующим возвращением к жизни после регидратации. Это интереснейшее явление природы, так как оно нарушает устоявшееся представление о незаменимости воды в клетке. Действительно, вода играет критическую роль в поддержании структуры клеток и участвует в огромном количестве химических реакций. Тем не менее время от времени она может быть недоступна организму (например, при засухе) и тогда единственный способ выжить – войти в ангидробиоз. А чтобы правильно это сделать, нужно задействовать множество процессов, например, усилить синтез некоторых генов и накопить защитные вещества.

Личинка хирономиды *Polypedilum vanderplanki* – крупнейшее многоклеточное животное, способное к ангидробиозу (Gatto и др., – 2015). Было установлено, что при индукции ангидробиоза в ней активируется множество генов, продукты которых могут играть защитную роль. Однако, данные об изменениях генной экспрессии ранее не были подтверждены на уровне белков. В настоящей работе это сделано путём анализа протеома культуры клеток, выделенных из *P. vanderplanki* (культуры клеток Pv11), при моделировании индукции ангидробиоза за счёт обработки трегалозой.

Цель

Целью настоящего исследования является анализ протеомных данных клеточной культуры Pv11, выделенной из *P. vanderplanki*, при моделировании индукции ангидробиоза за счёт обработки трегалозой.

Задачи

1) Проанализировать, как при моделировании ангидробиоза в клетках Pv11 изменяется экспрессия белков антиоксидантной системы и белков, закодированных специфическими для *P. vanderplanki* генами (LEA, метилтрансферазы, тиоредоксины). Сопоставить протеомные данные с данными транскриптома.

- 2) Выявить метаболические пути, индуцируемые на уровне белков при моделировании ангидробิโอ́за в клетках Pv11.
- 3) Выявить участки хромосом, обогащенные генами с высокой индукцией на уровне белка при моделировании ангидробิโอ́за в клетках Pv11.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Понятие ангидробиоза

Ангидробиоз – это явление, связанное с частичным или полным высыханием живых организмов и сохранением их жизнедеятельности после регидратации. Это состояние было открыто голландским натуралистом Антони ван Левенгуком в 1701 году и с тех пор изучалось многими поколениями биологов.

Вода – незаменимый компонент любых форм жизни и необходима для большинства биологических процессов. На клеточном уровне она играет ключевую роль в поддержании формы белков и образовании фосфолипидов в биологических мембранах. Тем не менее, некоторые организмы, называемые ангидробионтами, способны переживать экстремальную потерю воды в течение длительного периода времени. Среди них есть растения, животные (например, нематоды и насекомые), грибы (сахаромицеты и другие дрожжи) и прокариоты. Исследования показывают, что многие ангидробиотические организмы синтезируют большой объем сахаров (в основном дисахаридов, таких как трегалоза), внутренне неупорядоченных белков (IDP) и белков теплового шока (HSP). Считается, что эти молекулы стабилизируют и сохраняют структуру мембран и белков, что позволяет предотвратить повреждение клеток при обезвоживании.

В данном обзоре представлены основные теоретические концепции, связанные с ангидробиозом и примеры его проявления у различных организмов, в том числе у африканского комара *P. vanderplanki*, который является предметом нашего исследования. Кроме того, подробно изучены методы биоинформатического анализа белков для дальнейшего применения этих сведений при проведении анализа протеомных данных комара и выявлении потенциально важных для индукции ангидробиоза белков.

1.2 Факторы успешного ангидробиоза у различных организмов

Первое предположение относительно механизмов толерантности к ангидробиозу было получено из исследований на нематодах. Было выяснено, что при медленном высушивании, нематоды накапливают значительное количество

трегалозы (Erkut и др., – 2011). Это позволило предположить, что существует некоторая корреляция между выживаемостью в высушенном состоянии и выработкой этого дисахарида. Последующие исследования установили аналогичную корреляцию между выживаемостью многих организмов при высушивании и наличием у них дисахаридов: трегалозы или, в случае высших растений, сахарозы (Erkut и др., – 2013). Выяснилось, что трегалоза критически необходима для выживания некоторых видов круглых червей при засухе и что мутанты, лишенные способности синтезировать этот сахар, не выживают даже при умеренном обезвоживании (Madin, Crowe, – 1975). Аналогичные результаты были ранее получены при изучении мутантов дрожжей, в которых нарушен синтез трегалозы и его транспортера. Исследования с модельными системами (изолированными биологическими мембранами, липосомами и белками) подтвердили, что трегалоза обладает заметной способностью сохранять эти соединения в сухом состоянии. Дальнейшие исследования помогли раскрыть механизм, с помощью которого это происходит: по-видимому, трегалоза образует водородные связи с полярными остатками в белках и фосфолипидах мембран и придает сухим молекулам такое же физическое состояние, которое наблюдается в присутствии воды. Этот механизм известен как гипотеза замещения воды (Crowe, – 2014). В обезвоженном состоянии насыщенная трегалозой цитоплазма представляет собой стекловидную массу, которая поддерживает нужную структуру биомолекул и предотвращает их неблагоприятные взаимодействия. Данный эффект называется витрификацией.

Высокая эффективность защиты, обеспечиваемой трегалозой, связана со следующими факторами:

- 1) Гликозидная связь, связывающая два мономера глюкозы, необычно стабильна – намного более стабильна, чем, например, связь в сахарозе.
- 2) Биологическое стекло, образованное трегалозой, обладает более высокой температурой плавления, по сравнению с другими сахарами, и более стабильно при равных условиях.

Благодаря этим свойствам трегалоза нашла применение в практической деятельности: она успешно используется для сохранения тромбоцитов в высушенном состоянии без необходимости их заморозки (Wolkers и др., – 2001; Wolkers, Tablin, Crowe, – 2002). Тем не менее, для успешного высушивания и оживления большинства клеток одной трегалозы недостаточно. Клетки хоть и могут пережить высушивание, но их восстановление до изначального состояния может оказаться невозможным. В этом случае может помочь трансфекция клеток белками ангидробионтов, в частности, HSP и LEA-белками (Hibshman, Clegg, Goldstein, – 2020).

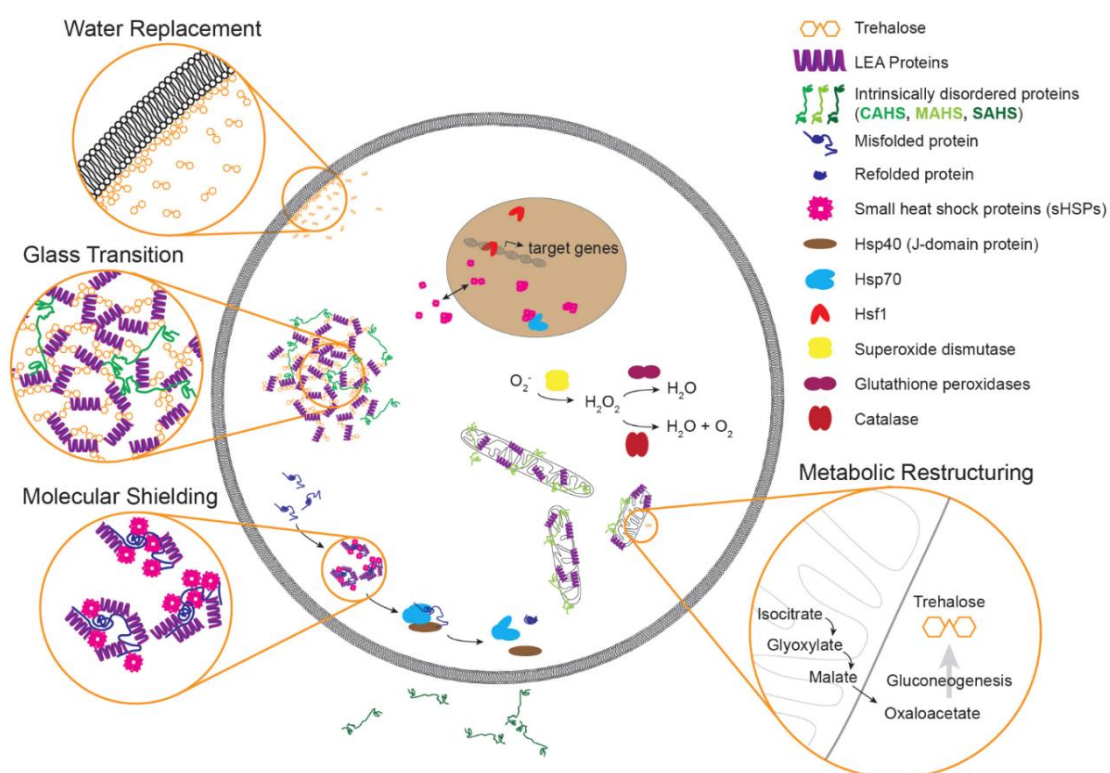


Рисунок 1 – Иллюстрация молекулярных компонентов и механизмов, связанных индукцией ангидробиоза (Hibshman, Clegg, Goldstein, – 2020)

Кроме самой трегалозы значительную роль в ангидробиозе играют белки, участвующие в её метаболизме, в частности, TRET1, TREN, TPS и TPP.

TRET1 – транспортер трегалозы-1. В норме мембраны клеток непроницаемы для трегалозы, поэтому наличие транспортера крайне важно. Экспрессия гена этого белка у *P. vanderplanki* усиливается при высушивании или при увеличении

концентрации ионов внутри клетки. 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, трегалоза перестает расщепляться и начинает накапливаться в клетках.

Для успешного вхождения в ангидробиоз необходимо повышение экспрессии трегалоза-6-фосфат синтазы (TPS), трегалоза-6-фосфат фосфатазы (TPP) и трегалазы (TREN). Эти ферменты являются ключевыми в метаболизме трегалозы. Гены TPS были найдены у многих беспозвоночных, включая коловартку *Adineta vaga*, нематоду *C. elegans*, низшее ракообразное *Aphelenchus avenae* и плодовую мушку *Drosophila melanogaster* (Hespeels и др., – 2015). TPS участвует в классическом метаболическом пути трегалозы, синтезируя трегалозо-6-фосфат из глюкозо-6-фосфата. А TPP, трегалозо-6-фосфат фосфатаза, завершает синтез трегалозы, отщепляя фосфатную группу трегалозо-6-фосфата.

Толерантность к недостатку воды у ангидробионтов может приобретаться или усиливаться в результате воздействия некоторых стрессов, которые могут и не быть напрямую связаны с высыханием. Например, у растений приобретение толерантности к высыханию вызывается частичным обезвоживанием, воздействием растворов высокой солёности и повышением содержания АБК (Hoekstra, Golovina, Buitink, – 2001), а у тихоходок и дрожжей она может индуцироваться недостатком питания (Khroustalyova и др., – 2019; Welnicz и др., – 2011).

В некоторых ангидробиотических микроорганизмах были обнаружены только небольшие количества дисахаридов, даже трегалозы (Alpert, – 2005). Это позволяет предположить, что должны существовать альтернативные способы достижения той же цели, не требующие участия дисахаридов.

Далее будут более подробно рассмотрены особенности ангидробиоза у некоторых организмов.

1.2.1 Ангидробиоз у бактерий

Согласно экспериментальным данным, грамположительные бактерии наиболее устойчивы к недостатку воды среди прокариот (García, – 2011). Большинство способных к ангидробиозу бактерий накапливают значительные объемы Mn^{2+} . В высушенном состоянии они демонстрируют высокую устойчивость к ионизирующему излучению (Alpert, – 2005). Способностью к ангидробиозу обладают также цианобактерии, хоть для них и характерна клеточная стенка грамотрицательного типа. Возможно, причина их устойчивости кроется в том, что филогенетически они близки к грамположительным бактериям (Fredrickson и др., – 2008).

При недостатке воды в клетке активные формы кислорода наносят непоправимый ущерб, в частности, повреждая белки и окисляя липиды мембраны (Wojciechowska и др., – 2021). Один из способов этого избежать - повысить в клетке температуру фазового перехода липидов. Это вполне осуществимо и достигается увеличением ненасыщенности липидов клеточной мембраны. Но из-за этого повышается также уровень окисления фосфолипидов, что крайне нежелательно. Кроме того, гидрофильные головки таких липидов формируют АФК при действии ионов Fe^{2+} , что сокращает продолжительность жизни клетки (Vasilenko и др., – 2004).

Негативное влияние недостатка воды заметно и на других группах молекул: например, белках. при нехватке воды увеличивается концентрация H_2O_2 , реагирующей с Fe^{2+} , которая затем связывается с металлсвязывающим сайтом белков. Такая модификация делает белки менее стойкими к протеолизу, и они могут значительно снизить свою биологическую активность. Кроме того, некоторые аминокислотные остатки таких белков превращаются в карбонильные, что также снижает функциональность белков и считается одним из самых значительных влияний ангидробиоза на клетки (García, – 2011).

Для сохранения стабильного состояния, ДНК в клетке должна оставаться в жидкой среде. Недостаток воды может оказать значительное влияние на такие процессы как репликация, транскрипция и синтез белков (Potts и др., – 2005). Ещё одно вредное действие недостатка воды заключается в выработке радикалов ОН, которые считаются одними из самых реактивных форм активного кислорода и приводят к множеству опасных для клетки мутаций (Fredrickson и др., – 2008).

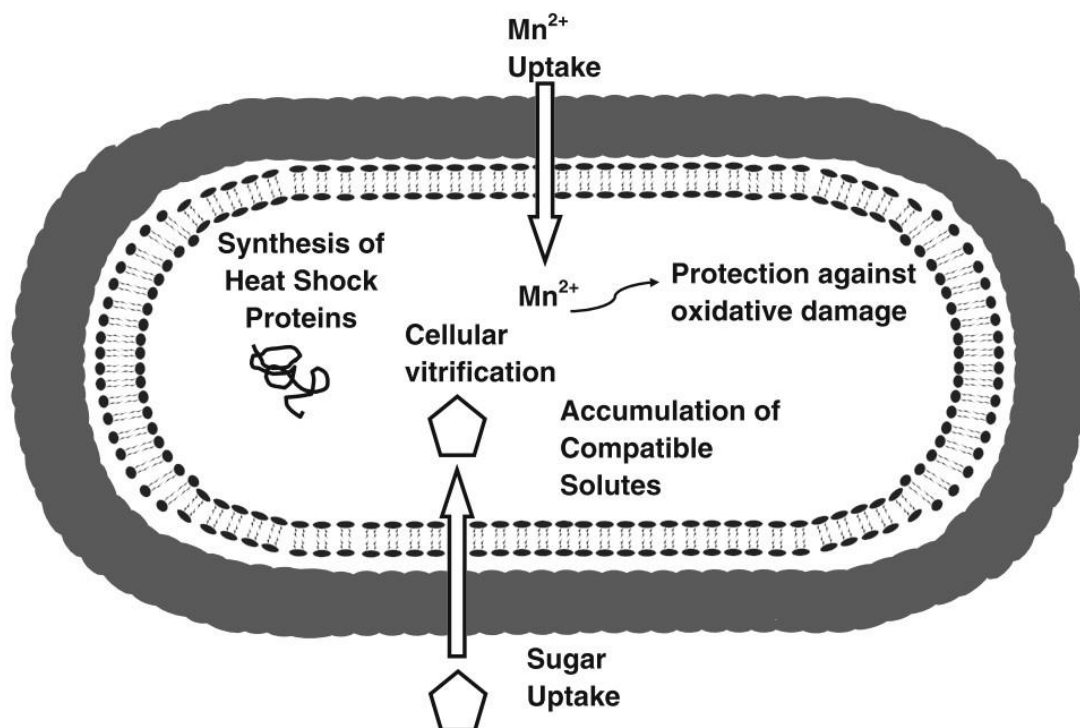


Рисунок 2 – Общие механизмы толерантности к высыханию у бактерий. По (García, – 2011)

Уровень содержания воды в высушенной клетке может падать до очень низких значений: сообщается о снижении содержания воды в бактериальных клетках до 2% (Potts и др., – 2005). Также известно, что толерантные цианобактерии способны восстановить до 50% своей нормальной активности в фотосистеме II всего за 2 мин после регидратации. Было показано, что существует корреляция между толерантностью к недостатку воды и устойчивостью к ионизирующему излучению у различных штаммов *Deinococcus radiodurans*. Эти данные наводят на мысль о том, что устойчивость к обезвоживанию и радиационная устойчивость могут

регулироваться аналогичными молекулярными механизмами (Vasilenko и др., – 2004).

Многие грамположительные виды накапливают Mn^{2+} . Предполагается, что этот ион участвует в защите белков от окислительного повреждения, вызываемого, в частности, активными формами кислорода. Исследования обнаружили значимую корреляцию между внутриклеточным уровнем ионов марганца и устойчивостью к обезвоживанию у нескольких родов бактерий (Vasilenko и др., – 2004).

Кроме того, высокая толерантность к радиоактивности привела к открытию новых видов бактерий в радиоактивных рабочих зонах, которые были способны к ангидробиозу (Liu и др., – 2003).

1.2.2 Ангидробиоз у дрожжей

У дрожжей обезвоживание вызывает резкие структурные изменения почти во всех основных органеллах. Повреждаются компоненты клеточной стенки, происходит инвагинация плазматических мембран (França, Panek, Eleutherio, – 2007). Также сообщается о структурных изменениях ядерной мембраны и конденсации ДНК – как ядерной, так и митохондриальной (Ren и др., – 2020). Другие значительные изменения затрагивают структуру вакуолей, липидных капель и пероксисом. Было выявлено несколько метаболических путей, способных смягчить окислительные повреждения, вызванные недостатком воды (Dupont и др., – 2014).

Во время процесса высыхания внутриклеточная вода имеет решающее значение для поддержания активности ферментов, которые участвуют в адаптации к ангидробиозу. Однако ферментативная активность наблюдалась у дрожжей даже при длительной сушке (до 180 дней), когда уровень трегалозы был довольно низким вследствие её расщепления трегалазами. Мало что известно о том, как трегалазы остаются активными в этом сильно обезвоженном состоянии. Предполагается, что это возможно благодаря другим механизмам, защищающим клетки от последствий недостатка воды (Boothby, – 2019).

Все изученные штаммы ангидробиотических дрожжей, в частности, *Naganishia albida* и *Saccharomyces cerevisiae* показали значительную устойчивость

к высушиванию: их жизнеспособность после регидратации была близка к 100% (Khroustalyova и др., – 2019). Изменения плазматической мембраны также были минимальными и не приводили к летальным последствиям. Сообщается, что высокий уровень резистентности дрожжей может быть связан с химическим составом и молекулярной организацией их мембран (Ren и др., – 2020).

В исследовании 2020 года были выявлены процессы, ответственные за вхождение в состояние ангидробиоза в клетках *S. cerevisiae*. Оказалось, что значительные изменения можно наблюдать, в частности, в ЭПР клеток. Недостаток воды вызывает так называемый стресс ЭПР и приводит к потере белками их нормальной структуры, что служит одним из сигналов для вхождения в ангидробиоз (Ren и др., – 2020).

Ещё одно следствие недостатка воды у дрожжей – уменьшение вакуолей, которые являются самой большой органеллой дрожжевой клетки. Они выполняют функции, аналогичные функциям лизосомы у высших эукариот или растительной вакуоли. У грибов вакуоли служат основным местом деградации белков, особенно во время голодания. Было показано, что при высушивании в клетках дрожжей уменьшается размер и количество этих органелл и происходит это, предположительно, в результате аутофагии (Rapoport и др., – 2019).

1.2.3 Ангидробиоз у жаброногих ракообразных

Artemia franciscana – один из организмов, способных к ангидробиозу. Женские особи артемий при недостатке воды откладывают яйца, содержащие эмбрионы в фазе гаструлы, покрытые защитной оболочкой. Хотя защитная оболочка и не предотвращает утрату воды (тогда эти организмы нельзя было бы отнести к ангидробионтам), она значительно снижает темпы потери влаги, что дает личинке больше времени для выработки защитных механизмов, например, усиления синтеза гликогена и глицерола. Предполагается, что глицерол усиливает толерантность к переохлаждению и способствует более легкому выходу личинок из цисты (Hand и др., – 2016). Ещё одна молекула, ответственная за сохранность высушенных личинок – белок артемин. Являясь аналогом ферритина, он выполняет роль молекулярного шаперона и составляет до 7-13% общей массы высушенного

организма. К защитным шаперонам также можно отнести малые белки теплового шока и Hsp70.

Также в *A. franciscana* были обнаружены LEA-белки, характерные для растений и большинства ангидробиотических организмов. Считается, что они стабилизируют мембраны, предотвращают агрегацию белков и усиливают защиту от осмотического стресса (Hand, Menze, – 2015; Marunde и др., – 2013; Sharon и др., – 2009). Представители *A. franciscana* известны тем, что экспрессируют белки LEA одновременно трех разных групп: первой, третьей и шестой, которые локализуются в различных субклеточных компартментах, таких как цитоплазма, ядро, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, митохондрии и хлоропласты (Avelange-Macherel и др., – 2018; Boswell, Menze, Hand, – 2014). Было показано, что белок AfrLEA2 располагается по большей части в цитоплазме и ядрах, а AfrLEA3m - в митохондриях (Boswell, Menze, Hand, – 2014). Чуть позднее был также идентифицирован белок AfrLEA6. Он отличается тем, что его последовательность гомологична последовательности белков созревания семян (SMP), благодаря которым зрелые семена демонстрируют заметную устойчивость к обезвоживанию и способны храниться долгое время без потери всхожести. AfrLEA6 в настоящее время является единственным известным примером белка LEA группы 6 у животных. (Stiglic, Viner, – 2019). Известно, что AfrLEA6 характерен в основном для эмбрионов, находящихся в диапаузе. Его клеточная локализация, скорее всего, связана с цитоплазмой, так как ни в митохондриях, ни в хлоропластах белок обнаружен не был.

1.2.4 Ангидробиоз у тихоходок

Тихоходки - микроскопические организмы с 8 конечностями, способные выживать в широком диапазоне различных стрессовых факторов: экстремальных температур, радиации, низком давлении и недостатке воды. Более того, именно в высушенном состоянии они и демонстрируют большинство своих способностей к перенесению стрессов (Wełnicz и др., – 2011).

Для большинства ангидробионтов трегалоза - незаменимый компонент подготовки к успешной индукции ангидробиоза. Тем не менее, тихоходки зависят

от этой молекулы в значительно меньшей степени. Известны виды, которые могут вообще обходиться без неё, например, *Echiniscus granulatus*, *Echiniscus testudo* и *Hypsibius exemplaris* (Jonsson, Persson, – 2010).

У тихоходок было обнаружено несколько классов ангидробиоз-индуцируемых белков: CAHS, MAHS и SAHS. Предполагается, что это уникальные для тихоходок белки, которые не встречаются у других организмов и играют важную роль в защите клеточных структур при индукции ангидробиоза. Так же, как и для других ангидробионтов, для тихоходок характерны LEA-белки группы 3 и HSP – белки теплового шока.

Предположительно, в индукции ангидробиоза также участвуют неупорядоченные белки тихоходок (TDP). В отличие от большинства других известных белков, TDP не существуют в стабильной трехмерной конформации и механизм их работы до сих пор остается загадкой. Известно лишь то, что их присутствие играет критическую роль в толерантности тихоходок к различным стрессовым факторам, в том числе недостатку воды (Boothby и др., – 2017).

В недавнем исследовании было выяснено, что значительную роль в сохранении клеток при высыхании выполняет альтернативная оксидаза, железо связывающий белок внутренней мембраны митохондрий. Первоначально считалось, что этот белок характерен только для растений, некоторых грибов и протистов, но его присутствие было доказано и для различных беспозвоночных животных, за исключением насекомых (Wojciechowska и др., – 2021).

Альтернативная оксидаза позволяет осуществлять перенос электронов из комплексов дыхательной цепи через кофермент Q к кислороду без участия цитохромного пути, состоящего из комплексов по III и IV. В результате этот белок обеспечивает обходной путь, который высвобождает ограничения на пути цитохрома дыхательной цепи и, следовательно, участвует в реакциях окисления-восстановления, важных для метаболической пластичности клеток. А это в свою очередь очень важно для адаптации к стрессовым факторам, в том числе, недостатку воды (Hibshman, Clegg, Goldstein, – 2020).

1.2.5 Ангидробиоз у нематод

Способность выживать при недостатке воды была описана для нескольких круглых червей: *Aphelenchus avenae*, *Plectus murrayi*, *Panagrolaimus superbus*, *Ditylenchus dipsaci*, и *C. elegans*. Но только *C. elegans* способен выживать при потере влаги до 98% и единственный среди круглых червей способен переживать десикацию в специальной личиночной стадии, на которой он перестает питаться (dauer state) (Erkut и др., – 2011; Erkut и др., – 2013). Благодаря своей распространенности в лабораториях и простоте строения *C. elegans* стал широко используемым модельным организмом для изучения ангидробиоза.

Идентификация генов *C. elegans*, ответственных за ангидробиоз происходила двумя способами. Первый способ – выявление изменения концентрации мРНК при высыхании и сравнение его уровня с обычным состоянием. Второй способ – выключение потенциально важных для ангидробиоза генов и наблюдение за последствиями для организма (Gade и др., – 2020).

При высыхании *C. elegans* также происходят важные метаболические преобразования: в частности, включается глиоксилатный шунт, который является альтернативой цикла трикарбоновых кислот. Этот факт доказывается тем, что делеция белка ICL-1, активирующего ферменты глиоксилатного цикла (изоцитрат лиазу и малат синтазу), приводит к непереносимости высыхания. (Erkut и др., – 2013).

Так же, как и в случае с другими ангидробионтами, немалую роль в индукции ангидробиоза играют LEA-белки. *C. elegans* при обезвоживании синтезирует два LEA-белка группы 3: lea-1 и dur-1.

Десатурация жирных кислот также выполняет важную роль в устойчивости к высыханию. Известно, что при индукции ангидробиоза синтез десатураз статистически значительно повышается, что свидетельствует о их роли в этом процессе (Hibshman, Clegg, Goldstein, – 2020).

Недавнее исследование транскриптома внекорневой нематоды *Aphelenchoides fragariae* при высыхании выявило гены, значительно повышающие свою экспрессию в ответ на нехватку воду. Авторы использовали секвенирование РНК и

анализ транскриптома *de novo* для сравнения паттернов экспрессии генов между высушенными в течение 24 часов нематодами и контрольной группой, не подвергавшейся высушиванию. Гены, кодирующие ферменты систем детоксикации фазы I и фазы II, HSP, гены ферментов реакции на денатурированный белок и гены внутренне неупорядоченных белков также показывали значительное повышение экспрессии, по сравнению с контрольной группой (Fu, Agudelo, Wells, – 2020).

Таким образом, изучение ангидробиоза нематод позволило выявить новые группы генов, способствующих устойчивости к высыханию. Не исключено, что те же или схожие гены и их продукты будут обнаружены у других ангидробионтов.

1.3 Строение и жизненный цикл *P. vanderplanki*

P. vanderplanki – двукрылое насекомое семейства Chironomidae, которое обитает в северной Нигерии, Уганде и некоторых других полувасушливых регионах африканского континента. Его личинки сосредоточены в небольших углублениях внутри скал, в которых скапливается вода. В период засухи эта вода высыхает, оставляя личинок без доступа к влаге в сухом иле. В таких сложных условиях личинки вынуждены войти в состояние ангидробиоза, чтобы поддержать существование и дождаться следующего периода дождей.

Полный цикл своего развития *P. vanderplanki* проходит примерно за 1 месяц: 2 дня в форме яйца, 3-4 недели в форме личинки, 1-2 дня в форме куколки и 2-3 дня – в виде взрослой особи. Способностью к высыханию с сохранением жизнеспособности обладают только личинки.

Личинки *P. vanderplanki* в высушенном состоянии способны сохранять жизнеспособность при крайне низких (-270°C) и высоких (106°C) температурах, которые смертельны для большинства живых организмов (Kikawada и др., – 2005). 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 , NaNO_3 ,

KNO₃, Na₂SO₄, K₂SO₄, NaH₂PO₄, KH₂PO₄ и CaCl₂), не только не убивают комара, но и стимулируют у него синтез трегалозы (Watanabe, Kikawada, Okuda, – 2003).

1.3.1 Факторы ангидробиоза у *P. vanderplanki*

Индукция ангидробиоза у *P. vanderplanki* опосредована участием большого количества молекулярных защитных факторов. 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). В связи с необходимостью синтеза трегалозы, успешность индукции ангидробиоза личинок *P. vanderplanki* зависит от продолжительности их высыхания. При медленном высушивании в течение 2 суток личинки накапливали в среднем 38 мкг трегалозы и сохраняли жизнеспособность. Быстрое высушивание в течение 1 суток позволило личинкам набрать всего лишь 6.8 мкг трегалозы и после регидратации они не были способны вновь оживать (Furuki и др., – 2019).

Немаловажная роль в индукции ангидробиоза у *P. vanderplanki* принадлежит белкам 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. Было показано, что экспрессия 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 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, можно предполагать, что HSC70 играет роль в сворачивании некоторых белков, ответственных за вход в состояние ангидробиоза. Те же функции 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, является ортологом белка p26 у *A. franciscana*, низшего ракообразного, которое также способен переживать высыхание. Пик экспрессии Pv-hsp20 наблюдается уже через 8 часов после начала высыхания и напоминает таковой у Pv-hsp90. В то же время пик экспрессии Pv-p23 приходится на конец процесса высыхания, что позволяет предположить его участие в процессах витрификации (Gusev и др., – 2014).

Ещё одна группа белков, важных для индукции ангидробиоза у *P. vandeplanki* – PIMT, ферменты, катализирующие восстановление поврежденных L-изоаспартил и D-изоацетильных 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. Было доказано, что накопление таких изомеризованных белков приводит к различным заболеваниям, например, к нейродегенеративным. Ферменты PIMT обнаруживают такие поврежденные белки и возвращают их структуру к исходному состоянию. Было показано, что данные ферменты вносят существенный вклад в увеличение продолжительности жизни нематод, в частности, для *C. elegans*. PIMT также часто встречаются в семенах растений (Mishra, Mahawar, – 2019). С учетом того, что обезвоживание клетки также значительно повреждает белки, можно предположить, что активность этого фермента будет увеличиваться в клетках комара при обезвоживании. В геноме *P. vanderplanki* было обнаружено 13 паралогов этого гена, тогда как у близкородственного вида, не способного к ангидробиозу (*P. nubifer*) вариант этого гена всего один, как и у большинства других насекомых. Экспрессия PIMT,

типичного для насекомых, не повышалась при высыхании в обоих видах хирономид, тогда как гены PIMT специфичные для *P. vanderplanki*, PvPimt2–14 показывали значительное повышение уровня экспрессии при вхождении в состояние ангидробиоза (Deviatiarov и др., – 2020).

LEA-белки, или белки позднего эмбриогенеза, характерны для растений и большинства ангидробионтов. В геноме *P. vanderplanki* было идентифицировано 27 генов Lea (PvLea), относящихся к LEA-белкам третьей группы. Было показано, что большинство из них локализованы в одном геномном кластере. В этом кластере также обнаружено 13 tandemно расположенных паралогичных генов, которые не имеют известных ортологов у других видов. Принимая во внимание их совместную локализацию с генами PvLea, вновь наблюдаемые гены были названы генами «LEA-island located» (Lil). Они не имеют известных ортологов, за исключением PvLea1 и PvLea3. Интересен тот факт, что белки PvLIL не имеют типичных признаков LEA-белков. Для трех LIL-белков была подтверждена их мембранная локализация. Известно, что они обладают четырьмя-пятью трансмембранными доменами каждый. Консервативные аминокислоты в PvLIL расположены в трансмембранных доменах или поблизости них. Было обнаружено, что гены PvLil значительно повышают экспрессию во время индукции ангидробиоза. Причем это характерно как для личинок *P. vanderplanki*, так и Pv11 – культуры клеток комара. Таким образом, индукция генов LEA в процессе ангидробиоза и наличие гомологичных им участков свидетельствуют о защитной роли LEA-белков при индукции ангидробиоза (Voronina и др., – 2020).

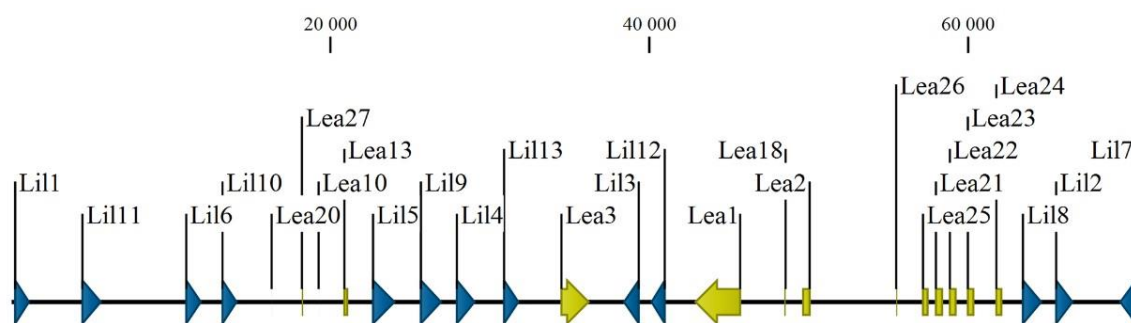


Рисунок 3 – Локализация генов PvLea и PvLil в ARId1 (Voronina и др., – 2020)

Не до конца ясно, каково происхождение в геноме *P. vanderplanki* генов LEA-белков, характерных в основном для растений. Исследования по протоколу BlastX не выявили явных гомологов. Тем не менее было найдено, что PvLea1 и PvLea5, самые длинные из всех LEA-белков у *P. vanderplanki*, демонстрируют наибольшее сходство с аналогичными белками у нематоды *C. elegans* и почвенной бактерии *Thiothrix flexiles*. Схожесть была подтверждена также на уровне белков, при помощи анализа по протоколу BlastP.

Для LEA-белков группы 3 характерны консервативные мотивы длиной 11 аминокислот. Распределение этих мотивов было аналогично таковому у *T. flexiles*, потенциальному донору LEA-белков. Это позволяет предположить, что гены, кодирующие LEA-белки могли быть получены от почвенной бактерии в естественной среде обитания бактерии.

Синтез антиоксидантов – незаменимая часть подготовки к вхождению в ангидробиоз. Экспрессия мРНК ключевых белков антиоксидантной системы значительно повышается у *P. vanderplanki* при вхождении в ангидробиоз, что позволяет организму бороться с активными формами кислорода, которые неизбежно возникают в условиях недостатка воды (Nesmelov и др., – 2018). В дополнение к антиоксидантам, известным для других насекомых, у *P. vanderplanki* были найдены ещё несколько специфических групп генов. Кроме того, было показано наличие нетипичных экзонов глутатион пероксидазы, что благодаря альтернативному сплайсингу увеличивает количество возможных вариантов этого фермента.

Тиоредоксины – белки антиоксидантной системы, присутствующие во всех организмах. Они участвуют в редокс-сигналинге и могут напрямую восстанавливать окисленный цистеин в других белках посредством тиол-дисульфидного обмена. Количество разновидностей TRX в животном геноме разнится в пределах от одного до пяти. Геном *P. vanderplanki* содержит 21 дополнительный ген этого белка, которые демонстрируют значительное усиление экспрессию в ответ на высушивание (Mazin и др., – 2018).

Хирономиды - единственная группа насекомых, у которых есть гемоглобины гемолимфы, выполняющие роль дыхательных белков, аналогичных таковым у позвоночных. Интересна дополнительная роль этих белков, которая заключается в аккумуляровании кислорода, что актуально в плохо насыщенных кислородом водоемах. В геноме *P. vanderplanki* показано наличие 33 копий этого гена. Паттерн их экспрессии похож на таковой у остальных насекомых, за исключением одного отличия: несмотря на то, что экспрессия гемоглобинов характерна в основном для личиночной стадии развития насекомого, гены PvHb11, PvHb12 и PvHb21 экспрессировались также в стадии яйца. Кроме того, обнаружилась группа генов (PvHb11, 12, 17, 23, 24, 25, 32 и 33), которая показывает значительное увеличение экспрессии при вхождении в состояние ангидробиоза, что свидетельствует о возможном участии гемоглобинов в данном процессе.

Аквапорины – белки, которые формируют проницаемые для молекул воды поры в клетке. В геномном исследовании *P. vanderplanki* их было обнаружено 5 разновидностей. Эти белки выполняют важную роль при вхождении в ангидробиоз: доказано что при обезвоживании ген *Aqp1* повышает свою экспрессию более чем в три раза. Его роль может заключаться в выведении воды из клетки (Nakahara и др., – 2010).

Микробиом *P. vanderplanki* также можно считать интересным объектом для исследования с точки зрения исследований ангидробиоза, так как он состоит преимущественно из прокариот, устойчивых к высыханию. Проведенное в 2020 году исследование показало, что соотношение царств прокариот в микробиоме взрослого комара и его личиночной стадии значительно отличается. В первом случае наиболее распространены актинобактерии и протеобактерии, тогда как во втором также значительную роль играют бактерии типа фирмикуты (Shaikhutdinov и др., – 2020).

1.4 Биоинформатический анализ протеомных данных

P. vanderplanki является немодельным объектом, что затрудняет биохимические исследования молекулярных факторов ангидробиоза в этом

организме. В связи с этим, значительный объём данных по индукции ангидробиоза в *P. vanderplanki* был получен путём биоинформатического анализа данных.

Протеом – совокупность всех белков организма, ткани или отдельной клетки в определённый период времени. Исследование протеома, как правило, нацелено на идентификацию и количественный анализ белков и пептидов в образце. Оно может использоваться для изучения происходящих в клетке процессов и выявления биомаркеров различных заболеваний. Количественный анализ протеома начинается с получения информации о количественном соотношении белков при определенных условиях при помощи масс-спектрометрии, которая позволяет идентифицировать пептиды и оценить их количество. 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 может быть использовано в диагностике онкологических, нейродегенеративных и других заболеваний (Gatto и др., – 2015).

Различия между физиологическими состояниями на клеточном уровне отражаются уровнем экспрессии и состоянием всех белков. Поэтому протеомика, которая направлена на изучение строения и взаимодействия белков способна довольно точно охарактеризовать состояние биологической системы. Главным образом по этой причине протеомика оказала огромное влияние на биологические исследования, в частности на изучение рака, обнаружение лекарств и целевых препаратов, а также исследования биомаркеров. Изначально она базировалась на данных, полученных при помощи двумерного гель-электрофореза. Однако в настоящее время в большинстве протеомных исследований используется масс-спектрометрия, так как она помогает быстро идентифицировать пептиды, сопоставляя их профили фрагментации с имеющимися базами данных последовательностей.

Как правило, после получения протеомных данных, проводят их статистическую обработку, а также анализ с применением специального программного обеспечения и визуализацию полученных результатов. Статистическая обработка – незаменимая часть анализа протеомных данных (Gatto

и др., – 2015). Она позволяет выделить только значимые отклонения в количествах белка, которые с высокой вероятностью 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. Как правило, такой анализ проводится с помощью специальных программ и пакетов для сред анализа данных. Примером могут служить пакеты `limma` и `ANOVA`. `ANOVA` в R в первую очередь предоставляет доказательства существования среднего равенства между группами. Этот статистический метод является продолжением t -критерия. Используется в ситуации, когда факторная переменная имеет более одной группы. В пакете `limma` для статистического анализа используют функцию, которая проводит t -test путем эмпирической байесовской модерации стандартных отклонений. Значения дифференциальной экспрессии при применении этого метода приводят к логарифмическому виду, что облегчает их анализ: значения ниже нуля показывают снижение концентрации, а значения выше – его повышение. За статистически достоверный результат принимают данные с p -value ниже 0.05.

В качестве инструмента обработки данных может использоваться R – открытое программное обеспечение, которое наиболее широко используется для статистической обработки и анализа данных. Для него создано множество дополнительных пакетов, в том числе, биоинформатических. 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. В частности, это могут быть пакеты проекта BioConductor (Sepulveda, – 2020) или другие пакеты среды, например, `chromoMap`, `fgsea` и `ggplot2`.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Получение данных и общая характеристика протеома клеток Pv11

Для исследования изменения экспрессии белков при индукции ангидробиоза использовалась клеточная линия Pv11, полученная из эмбрионов комара *P. vanderplanki* (Nakahara и др., – 2010; Watanabe и др., – 2016). По форме – это длинные веретенообразные клетки, свободно плавающие в клеточной среде. После обработки 0.6 М трегалозой в течение 48 часов, они способны переживать высушивание в течение длительного времени. После добавления воды часть клеток возвращается к нормальному метаболическому состоянию и продолжает пролиферацию. Тандемная масс-спектрометрия проводилась после 24 часов обработки трегалозой. Данная точка обработки трегалозой была выбрана в связи с тем, что паттерн индукции защитных генов на ней наиболее сходен с таковым в личинке при её обезвоживании. В качестве контроля использовались клетки Pv11, не получавшие такой обработки. Исследование было проведено в 4 повторностях. Таким образом, на входе имелаась таблица, содержащая название белка, его экспрессию 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.

Было решено изучить, существует ли корреляция между изменением экспрессии белка и такими его показателями, как молекулярный вес, длина и индекс GRAVY. Значение GRAVY (grand average of hydropathy) — это общее среднее значение гидрофобности белковых последовательностей. Оно вычисляется путём сложения значения гидрофобности для каждого аминокислотного остатка и деления на длину последовательности (Kyte, Doolittle, – 1982). Для подсчета этого показателя был использован язык программирования Python версии 3.7.9 совместно с библиотеками Pandas и BioPython. Сам анализ проводился при помощи метода `gravy`. Результат при помощи файла `.csv` был выгружен в среду R. Для визуализации был выбран метод `geom_point` пакета `ggplot2`. Для подсчета

корреляции был использован метод Пирсона и функция из стандартного пакета среды R с соответствующими аргументами.

Молекулярный вес полипептида был рассчитан при помощи метода `molecular_weight` из той же библиотеки BioPython в среде Python. Результаты были сохранены и переданы в R для анализа и визуализации. Для визуализации полученных результатов был выбран точечный график, который был составлен с помощью функции `geom_point` пакета `ggplot2`. С использованием функции `cor` была подсчитана корреляция этой переменной с изменением экспрессии белка.

GSEA (анализ обогащения по функциональной принадлежности) – это метод идентификации групп генов, которые обогащены в том или ином биологическом состоянии. Такой анализ позволяет выявить гены или белки, которые не были бы выявлены при обычном анализе, так как их экспрессия каждого отдельного гена или белка не повышалась достаточно сильно. В нашем случае выделялись белки, относящиеся к одному и тому же метаболическому пути по данным KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) и анализировалось совокупное изменение их экспрессии в клетках Pv11 при обработке трегалозой (Subramanian и др., – 2005). Для анализа использовалась функция `fgsea` из одноименного пакета среды R. Участие белка *P. vanderplanki* в том или ином метаболическом пути оценивалось по данным базы данных KEGG, с использованием предварительно аннотированных с помощью BLAST Koala KEGG-категорий (Kanehisa, Sato, Morishima, – 2016).

2.2 Язык и среда программирования

Анализ данных проводился в среде RStudio, с использованием языка R версии 3.6.0. Для исследования применялись функции из встроенных пакетов, а также таких сторонних пакетов, таких как Tidyverse, BioConductor, chromoMap, limma и fgsea. Визуализация проводилась с применением пакета ggplot2 (Gatto и др., – 2015). Также для получения значений GRAVY и молекулярной массы белков был использован язык программирования Python версии 3.7 вместе с библиотеками pandas, numpy и Biopython. Версии обоих языков программирования и используемых в них библиотеки были стабильными и не содержали критичных для настоящего исследования ошибок.

2.3 Сравнение изменения экспрессии белков с изменением экспрессии генов

Для сравнения изменений экспрессии гена и соответствующего белка были использованы опубликованные в 2014 году данные (Gusev и др., – 2014). В этом исследовании было проанализировано поведение генов в ответ на высушивание и регидратацию.

Результаты сравнения экспрессии генов и белков визуализировались с помощью двух графиков: боксплот для демонстрации размаха значений и точечный график, показывающий зависимость экспрессии белка от уровня экспрессии соответствующего гена. Для первого графика были использованы стандартные инструменты языка R – функция `boxplot` с аргументами. Для второго графика был использован пакет `ggplot2` и функция `geom_point`.

2.4 Анализ участков хромосом с генами белков с высокой индукцией при моделировании ангидробิโอ́за в клетках Pv11

Одной из ключевых особенностей ангидробิโอ́за *P. vanderplanki* является присутствие кластеров генов, содержащих специфические для данной хирономиды паралогичные семейства генов, значительная часть которых повышает экспрессию в ходе индукции ангидробิโอ́за. В связи с этим, мы проанализировали, в каких участках хромосом *P. vanderplanki* находятся гены с повышенной индукцией на уровне белка при моделировании ангидробิโอ́за в клетках Pv11. Для данного анализа использовался пакет `chromoMap` в среде R. Для визуализации расположения групп генов был выбран график со схематичным изображением хромосом, содержащий над изображением хромосом гистограммы с усреднённым изменением соответствующих белков (`fold change`) на соответствующих участках хромосом. Усреднение данных по изменению экспрессии проводилось на участках хромосом с длиной, по умолчанию установленной в `chromoMap` – 1 миллион пар оснований. Использование таких длинных участков позволяет снизить искажение данных из-за высоких значений индукции для отдельных белков, из-за включения данных для большого количества белков в усреднение на каждом участке.

2.5 Анализ функционального обогащения генов

Белкам *P. vanderplanki* были присвоены KEGG аннотации с использованием сервиса BLAST Koala, функциональная принадлежность белков к тому или иному процессу также оценивалась по данным KEGG. При аннотации белков, использовали их последовательности из текущей геномной сборки *P. vanderplanki*. Процессы с менее чем тремя аннотированными белками не анализировались.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Общая характеристика данных протеома клеток Pv11

Разведочный анализ включал в себя изучение основных свойств протеома: средних значений параметров, распределения белков по хромосомам, изменения экспрессии белков в клетках Pv11 при обработке их трегалозой в течение 24 часов. Всего в агрегированных на уровне белка протеомных данных культуры Pv11 в контроле и после обработки трегалозой суммарно идентифицировано 4490 белков, 2126 из которых статистически достоверно увеличивает экспрессию при обработке клеток Pv11 трегалозой. Медиана изменения экспрессии белков при индукции ангидробิโอ́за оказалась равной 0.95, минимальное - 0.04, а максимальное - 124.23. Значения для 25% образцов были выше 1.08 или ниже 0.84. Эти данные суммированы в графике, представленном на рисунке 4. Таким образом, экспрессия большинства белков при индукции ангидробิโอ́за в клетках Pv11 статистически значимо не изменяется.

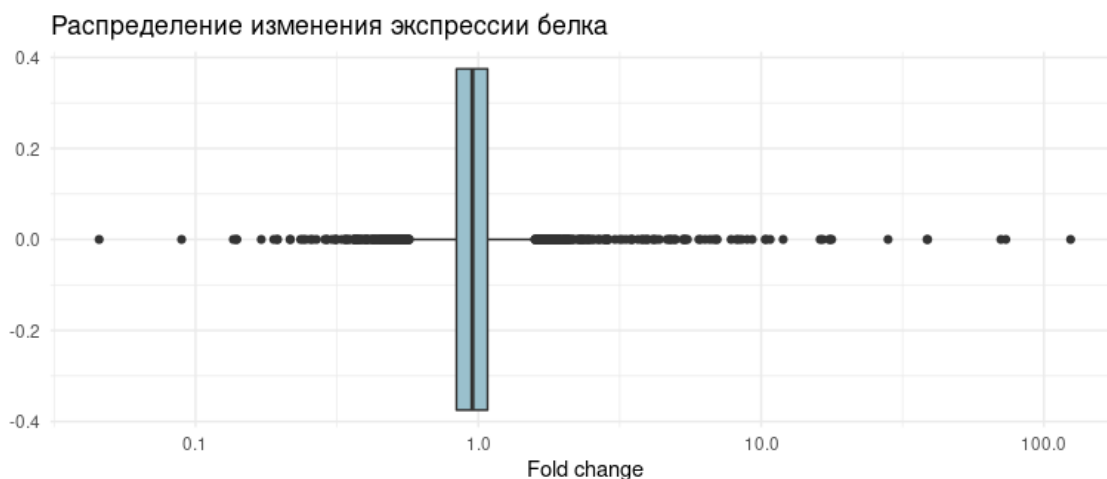


Рисунок 4 – Распределение значения десятичного логарифма изменений экспрессии белков при моделировании индукции ангидробิโอ́за в клетках Pv11

Мы сопоставили изменение экспрессии белков с такими показателями, как количество аминокислот в белке (рисунок 5), молекулярная масса (рисунок 6) и средняя гидрофобность, оценивая по значению индекса GRAVY (рисунок 7). Ни для одного из этих показателей значимой корреляции с изменением экспрессии белка обнаружено не было.



Рисунок 5 – Зависимость изменения экспрессии белков при моделировании индукции ангидробиоза в клетках Pv11 от количества аминокислот



Рисунок 6 – Зависимость изменения экспрессии белков при моделировании индукции ангидробиоза в клетках Pv11 от их молекулярной массы



Рисунок 7 – Зависимость изменения экспрессии белков при моделировании индукции ангидробиоза в клетках Pv11 от их гидрофобности, оцениваемой по значению индекса GRAVY

3.2 Сравнение изменения экспрессии белков с изменением экспрессии генов

Логично предположить, что экспрессия гена и соответствующего белка должны коррелировать между собой. Действительно, корреляция, вычисленная по методу Пирсона, между изменением экспрессии гена и его белка оказалась равной 0.44 с доверительным интервалом от 0.39 до 0.44 и p-value равным $22 \cdot 10^{-16}$. Это означает, что существует достоверная связь между этими показателями. Медиана и размах изменений экспрессии белка и гена, выраженных как \log_2 от fold change, практически совпадают.

Таким образом, можно сделать вывод, между fold change генов и белков наблюдается умеренная корреляция.

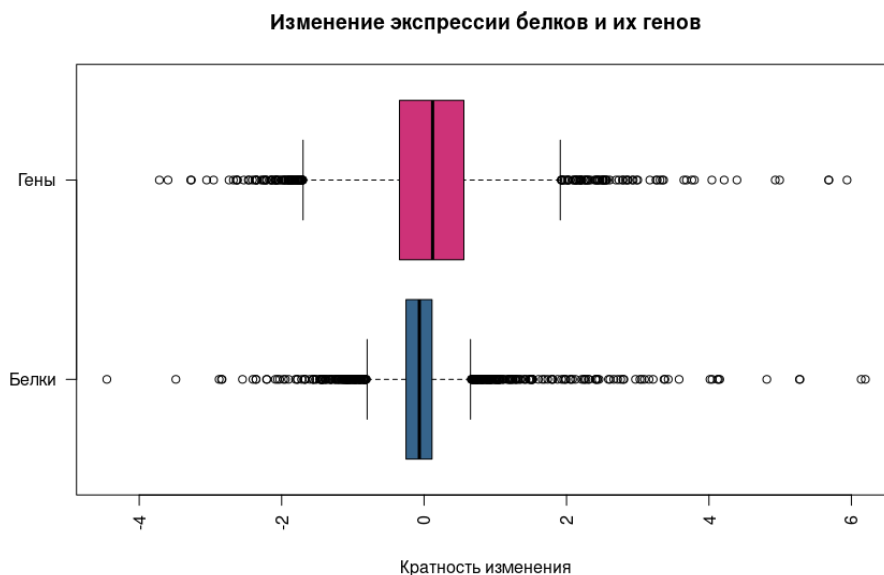


Рисунок 8 – Боксплоты распределений изменения экспрессии белка от изменения экспрессии соответствующего гена моделировании индукции ангидаптобиоза в клетках Pv11

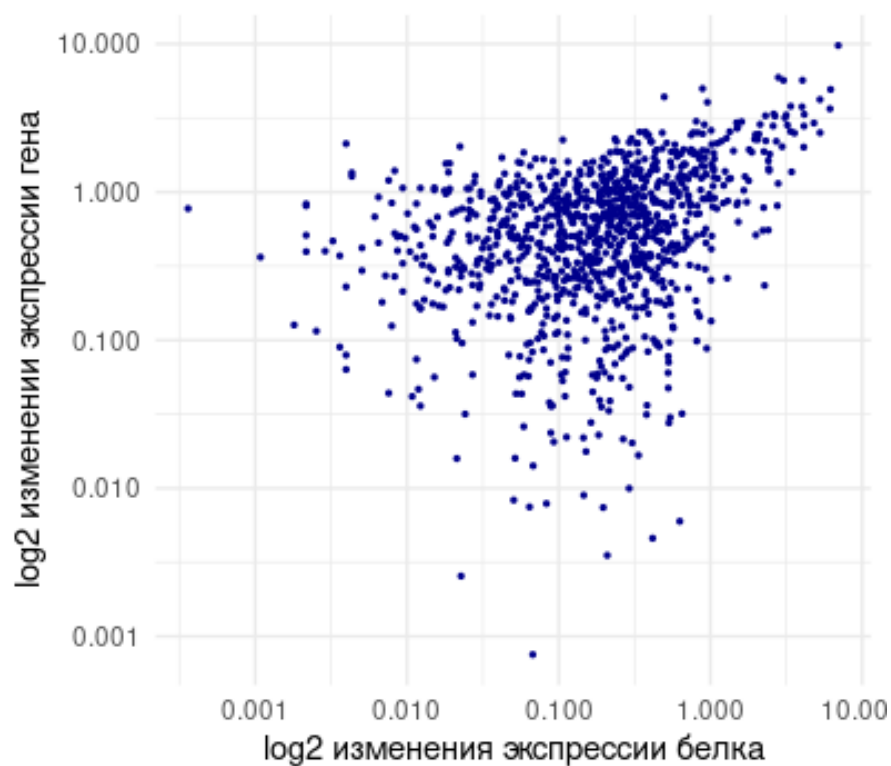


Рисунок 9 – Зависимость изменения экспрессии белка от изменения экспрессии гена при моделировании индукции ангидаптобиоза в клетках Pv11

3.3 Анализ протеомных данных белков, закодированных ангидробиоз-ассоциированными генами *P. vanderplanki*

Из более ранних исследований известно, что в геноме *P. vanderplanki* присутствуют уникальные гены с множественной дупликацией, значительная часть которых сильно повышает свою экспрессию при индукции ангидробиоза. К таковым прежде всего относятся LEA-белки, PIMT, HSP и гены тиоредоксинов. Кроме того, известна важная роль для успешной индукции ангидробиоза антиоксидантной системы и метаболического пути метаболизма трегалозы. Мы проанализировали данные протеома клеток Pv11 для белков вышеуказанных групп. Для каждого из белков в этих группах было проведено сравнение экспрессии при T24 (24 часа обработки трегалозой) и T0 (контроль). Кроме этого, мы сопоставили изменения экспрессии белков с изменениями экспрессии генов, чтобы оценить, насколько хорошо данные протеома подтверждают ранее полученные данные об индукции генов в *P. vanderplanki* при индукции ангидробиоза.

3.2.1 LEA-белки

LEA-белки выполняют важную роль при индукции ангидробиоза, предотвращая слипание белков и принимая участие в витрификации цитоплазмы. Согласно исследованию 2015 года (Hatanaka и др., – 2015), гены всех PvLEA белков показывали высокий уровень индукции при вхождении в ангидробиоз. В геноме комара всего было обнаружено 27 генов белков этого класса, однако при анализе протеома клеток Pv11 удалось выявить только 12 из них. Это связано с низкой экспрессией части белков в используемой культуре клеток. Среднее изменение экспрессии LEA-белков при моделировании индукции ангидробиоза в клетках Pv11 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 десикации снижается, тот факт, что LEA-белки, напротив, повышают свою экспрессию, указывает на их критически важную роль при индукции ангидробиоза.

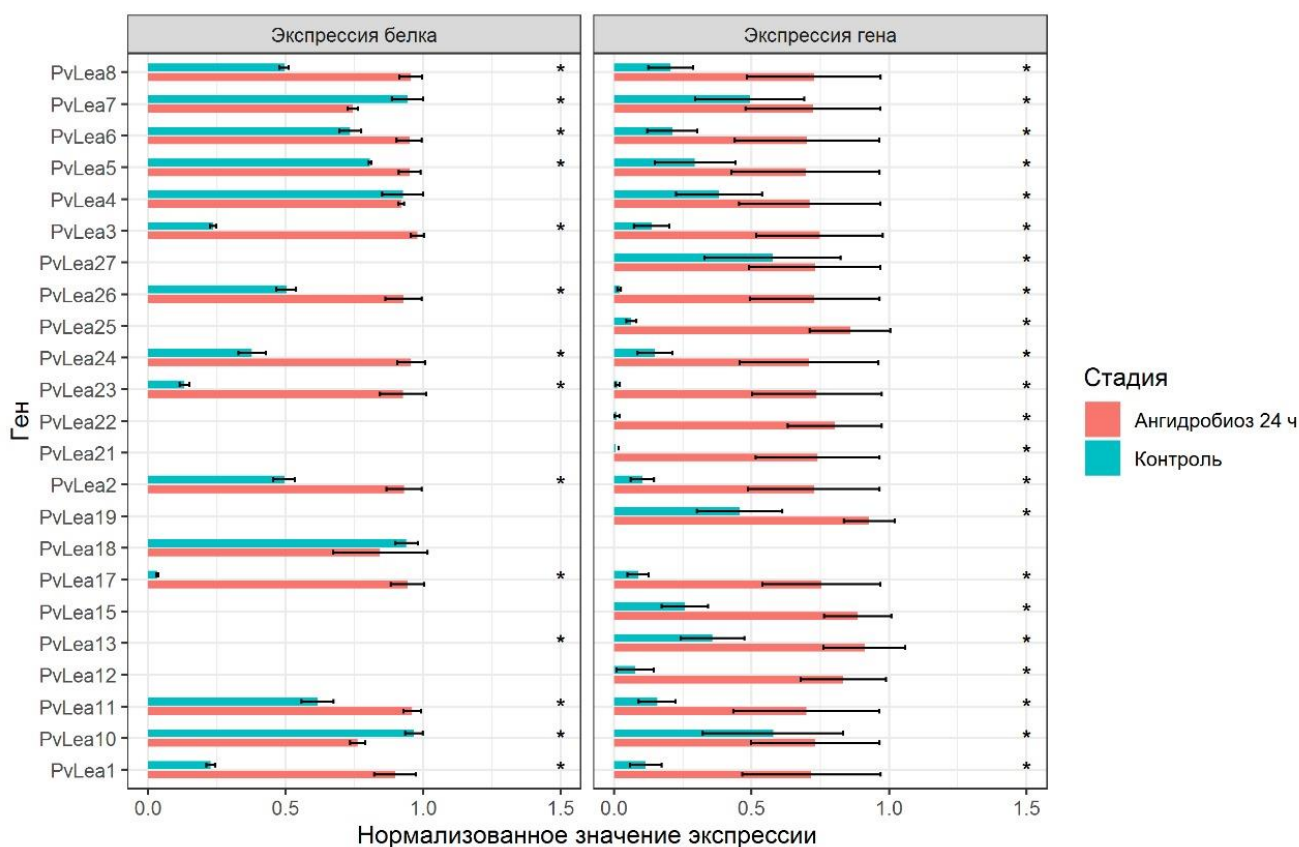


Рисунок 10 – Изменение экспрессии LEA-белков при моделировании индукции ангидробиоза в клетках Pv11

На уровне индивидуальных белков, подавляющее большинство LEA-белков при моделировании индукции ангидробиоза в клетках Pv11 увеличивали экспрессию. Только два из них понизили свою экспрессию: 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.

Для всех белков, кроме PvLea4 и PvLea18, изменения можно считать статистически значимыми, так как p -value, подсчитанный по методу эмпирической байесовской модерации стандартных отклонений показывает значение больше 0.05. А для двух упомянутых белков значимого изменения экспрессии не показано.

3.2.2 Антиоксиданты

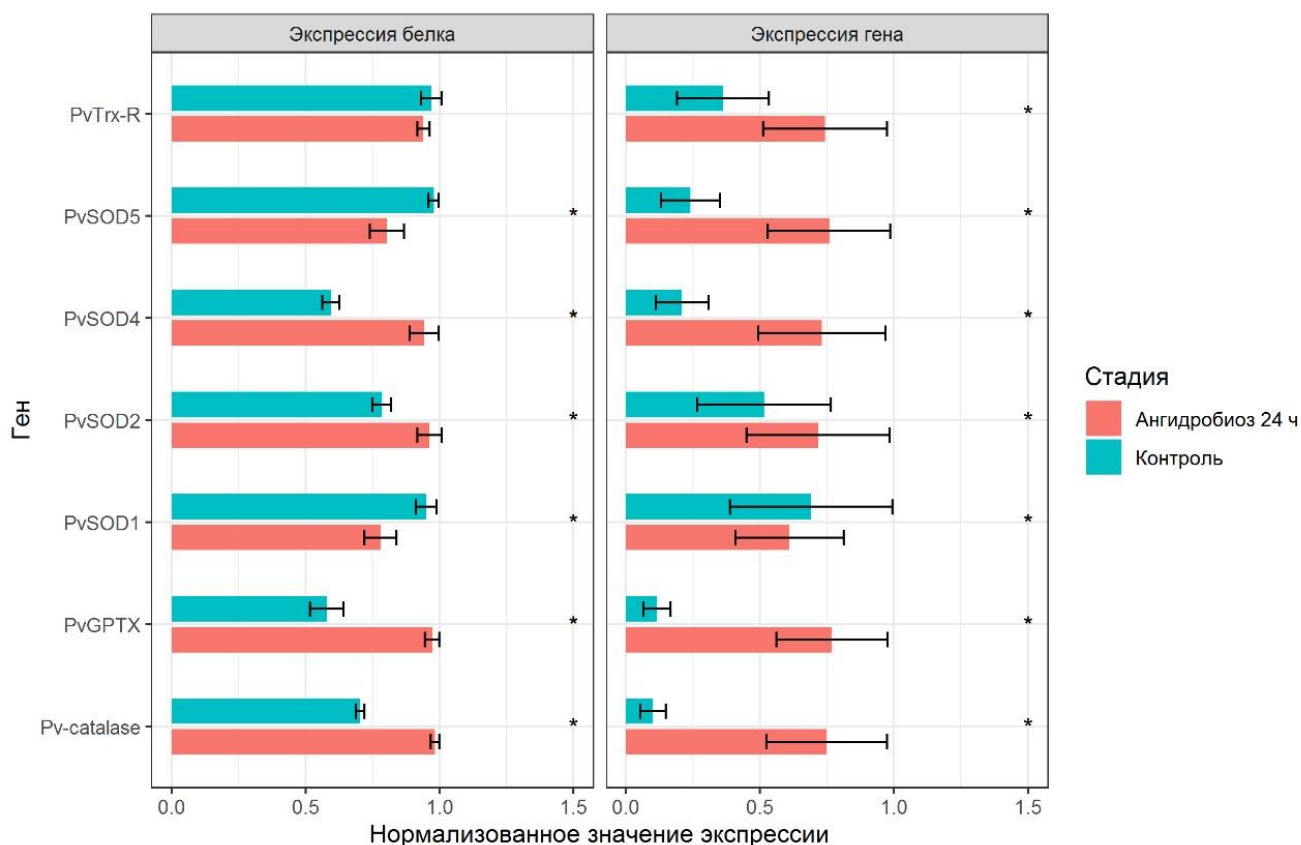


Рисунок 11 – Изменение экспрессии белков антиоксидантной системы при моделировании индукции ангидробиоза в клетках Pv11

Роль антиоксидантов при вхождении в ангидробиоз заключается в нейтрализации АФК, которые в большом количестве образуются в условиях недостатка воды.

Настоящее исследование протеомных данных показало, что среднее изменение экспрессии белков антиоксидантной системы в клетках Pv11 при моделировании индукции ангидробиоза равно 11,9 (медиана – 1,56), в то время как значение для всего протеома составляет 1,14 (медиана – 0,95). Согласно результатам анализа, часть антиоксидантов значительно повысила свою экспрессию. 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 экспрессия этих белков нестабильна. Среди

различных вариантов супероксиддисмутаз, присутствующих в *P. vanderplanki*, белки PvSOD-1 и PvSOD-5 показывали некоторое уменьшение экспрессии при моделировании ангидробиоза в клетках Pv11. Это позволяет предположить, что они, в отличие от других белков семейства супероксиддисмутаз, не выполняют ключевой роли при входе в состояние ангидробиоза. Для PvSOD-2 и PvSOD-4 значительного повышения или понижения экспрессии показано не было.

Все упомянутые выше изменения экспрессии белков являются статистически значимыми, за исключением изменений PvTrx-1.

3.2.3 Белки метаболизма и транспорта трегалозы

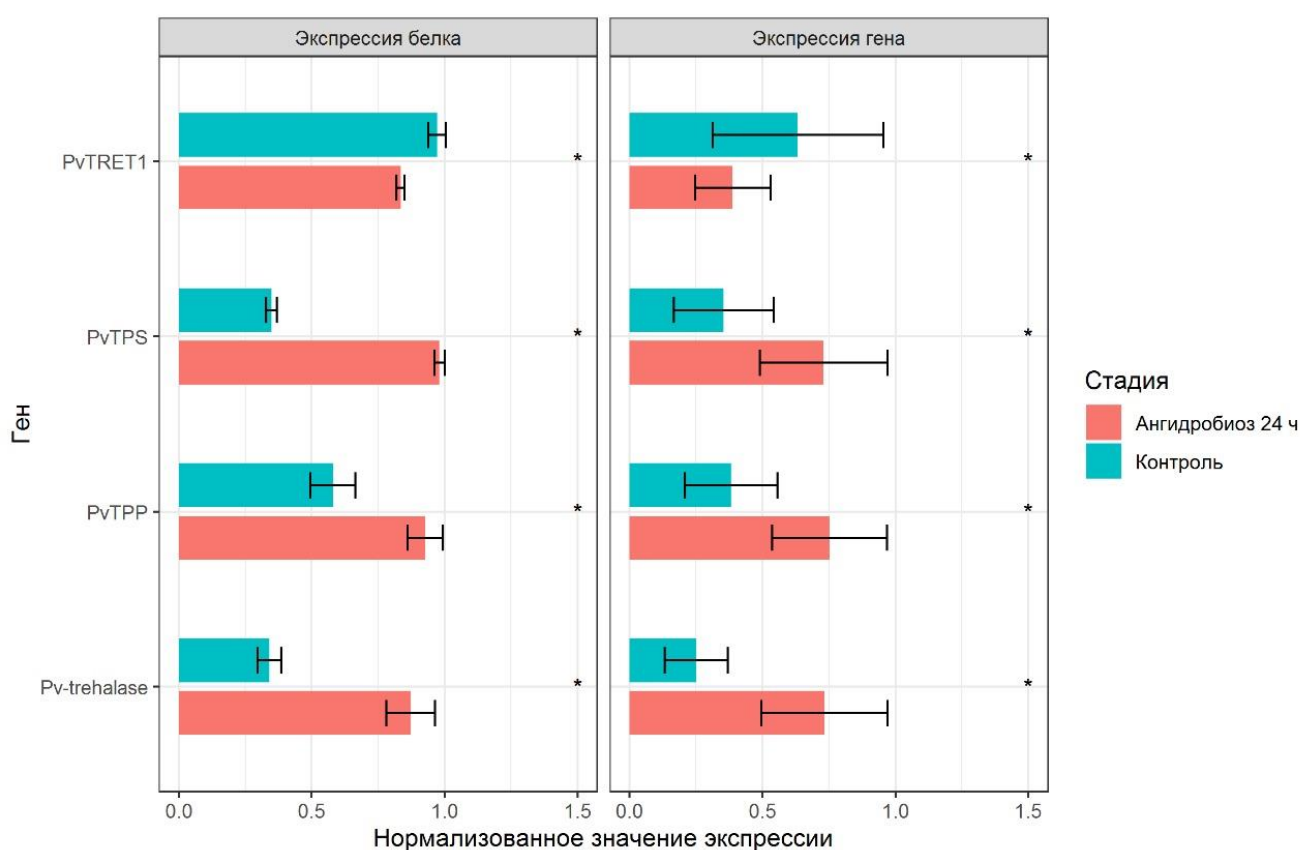


Рисунок 12 – Изменение экспрессии белков метаболизма трегалозы при моделировании индукции ангидробиоза в клетках Pv11

Трегалоза – дисахарид, который защищает клетку при вхождении в ангидробиоз. Было исследовано 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 обезвоживания клетки, увеличивается

синтез PvTPP и PvTPS, но снижается синтез PvTREN – фермента, расщепляющего трегалозу, что кажется вполне логичным с учётом растущей необходимости в трегалозе при индукции ангидробิโอ́за (Gusev et al., 2014). Однако результаты исследования белкового профиля показали повышение экспрессии 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 индукции ангидробิโอ́за, который, однако, не приводит к снижению экспрессии фермента. Также значительно понижается количество белка TRET-1. Его экспрессия меняется в 0,86 раз ($p\text{-value} = 4,13 \cdot 10^{-6}$). Это крайне важный транспортер, отвечающий за доставку трегалозы в клетки организма, и обнаруженное снижение его экспрессии противоречит фактам усиленного синтеза трегалозы при индукции *P. vanderplanki* с одной стороны, и невозможности доставки трегалозы в клетки без участия данного белка, с другой. Однако, трегалоза – это дисахарид, который служит не только для вхождения в состояние ангидробิโอ́за, но и как основной источник энергии для жизнедеятельности *P. vanderplanki*. В связи с этим, можно предположить, что фоновая экспрессия данного белка достаточно высока, чтобы обеспечить транспорт трегалозы при индукции ангидробิโอ́за, и его индукция на уровне белка не требуется.

3.2.4 Протеин-метилтрансферазы

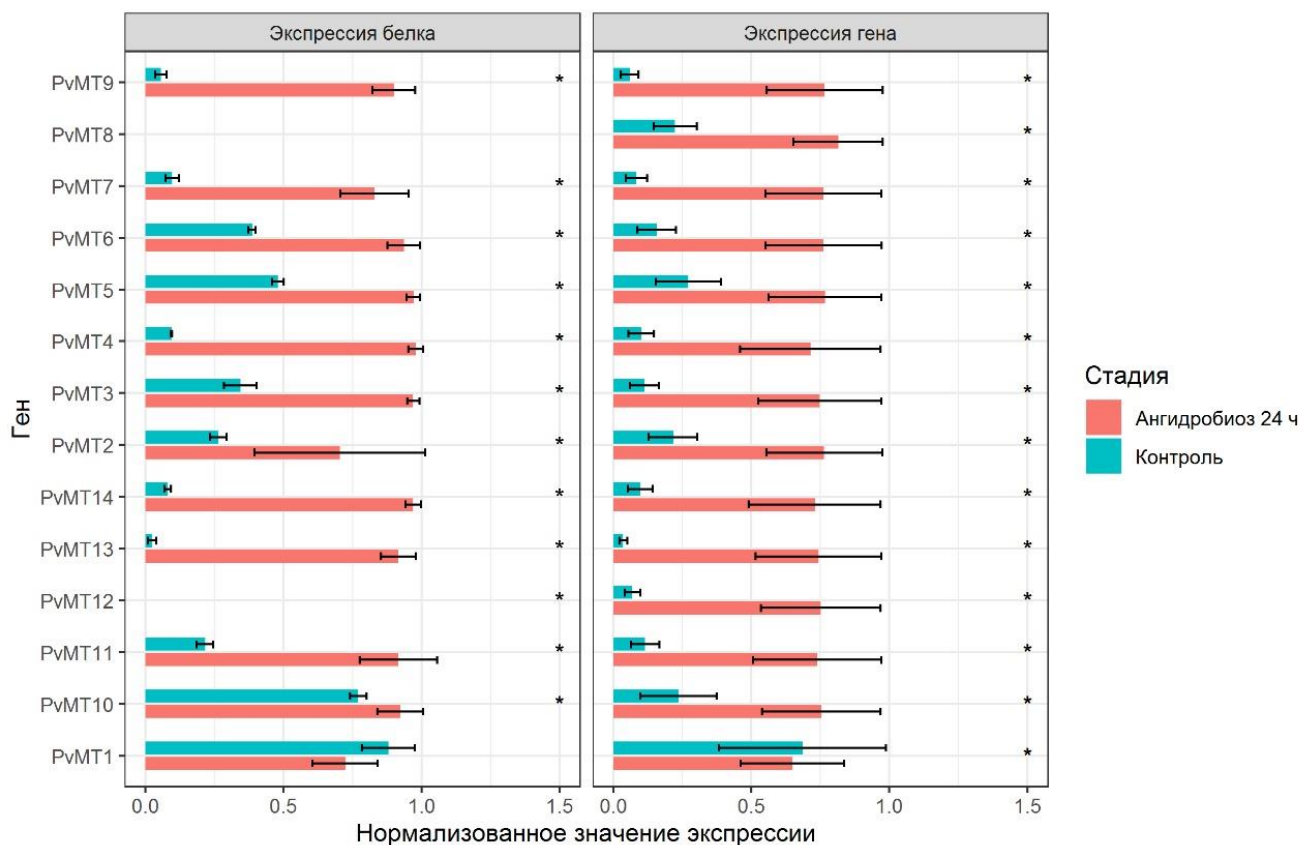


Рисунок 13 – Изменение экспрессии РІМТ (метилтрансфераз) при моделировании индукции ангидробиоза в клетках Pv11

РІМТ – 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 личинок *P. vanderplanki* значительно повышают свою экспрессию при индукции ангидробиоза (Gusev et al., 2014). В настоящем исследовании были получены сходные результаты и для соответствующих белков. Из 13 РІМТ, присутствующих в геноме *P. vanderplanki*, в протеоме клеток Pv11 идентифицировано 11, отсутствуют PvMT-6 и PvMT-8.

Среднее изменение экспрессии белков метилтрансфераз в клетках Pv11 при индукции ангидробиоза оказалось равным 9,7 (медиана – 6,4). Это показывает, что в среднем метилтрансферазы сильнее увеличивали свою экспрессию при моделировании ангидробиоза, чем остальные белки протеома. Практически все

индивидуальные метилтрансферазы также демонстрируют значительное изменение экспрессии при вхождении клетки в ангидробิโอ́з. Исключение – PvMT-1, который не показывает значительных отличий. Ген этого белка также не показывал увеличения экспрессии при индукции ангидробิโอ́за в клетках Pv11. Данный ген консервативен и не является уникальным для *P. vanderplanki* – он характерен для множества других организмов. 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 экспрессии изученных белков PIMT в культуре клеток Pv11 при моделировании индукции ангидробิโอ́за прямо пропорционально дифференциальной экспрессии их генов и легко объяснимо с точки зрения их функции.

Для всех указанных выше белков, кроме PvMT1, изменение экспрессии было статистически значимым.

3.2.5 Белки теплового шока

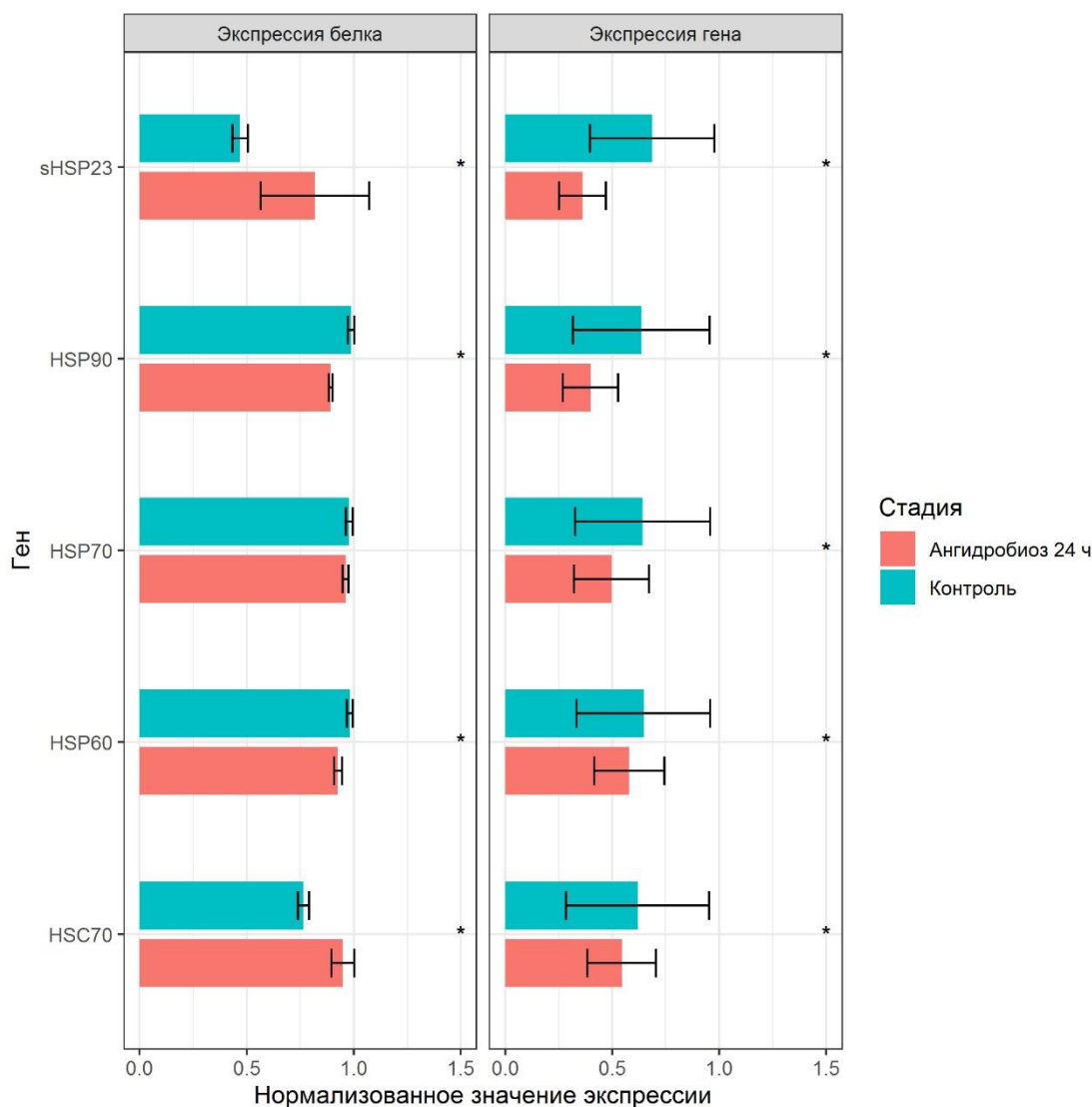


Рисунок 14 – Изменение экспрессии HSP при моделировании индукции ангидробиоза в клетках Pv11

HSP – крайне важные молекулы для большинства клеток. Они защищают белки от воздействия различных стрессовых воздействий, 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.

Больше всего в протеоме было обнаружено малых белков теплового шока HSP20. Также был обнаружен один белок HSP40 и 6 белков HSP90. Самое ощутимое изменение экспрессии было замечено для белка HSP20 – продукта гена

Pv.12121, его экспрессия за период высушивания увеличилась в 38 раз. Крайне низкое содержание в нормальном состоянии дает возможность предположить, что этот белок выполняет значительную роль при вхождении клетки в состояние ангидробиоза. 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 и др., – 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 показаниям после добавления воды.

Все эти данные позволяют предположить, что продукт гена Pv.12121 играет крайне важную роль в процессах ангидробиоза и способствует сохранению клетки в экстремальных условиях. Продукт гена Pv.02259 также показал значительное изменение экспрессии при обезвоживании клетки. По результатам анализа в программе BLASTP сходных последовательностей у других организмов обнаружено не было. Оба этих белка относятся к малым HSP, характерной структурой которых является наличие α -кристаллинового домена. Считается, что белки группы HSP20 выполняют роль шаперонов во входящей в ангидробиоз клетке, защищая её оксидативного стресса и агрегации молекул (Cornette, Kikawada, – 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 и др., – 2014), что соответствует результатам нашего анализа.

3.3 Анализ участков хромосом с генами белков с высокой индукцией при моделировании ангидробิโอ́за в клетках Pv11

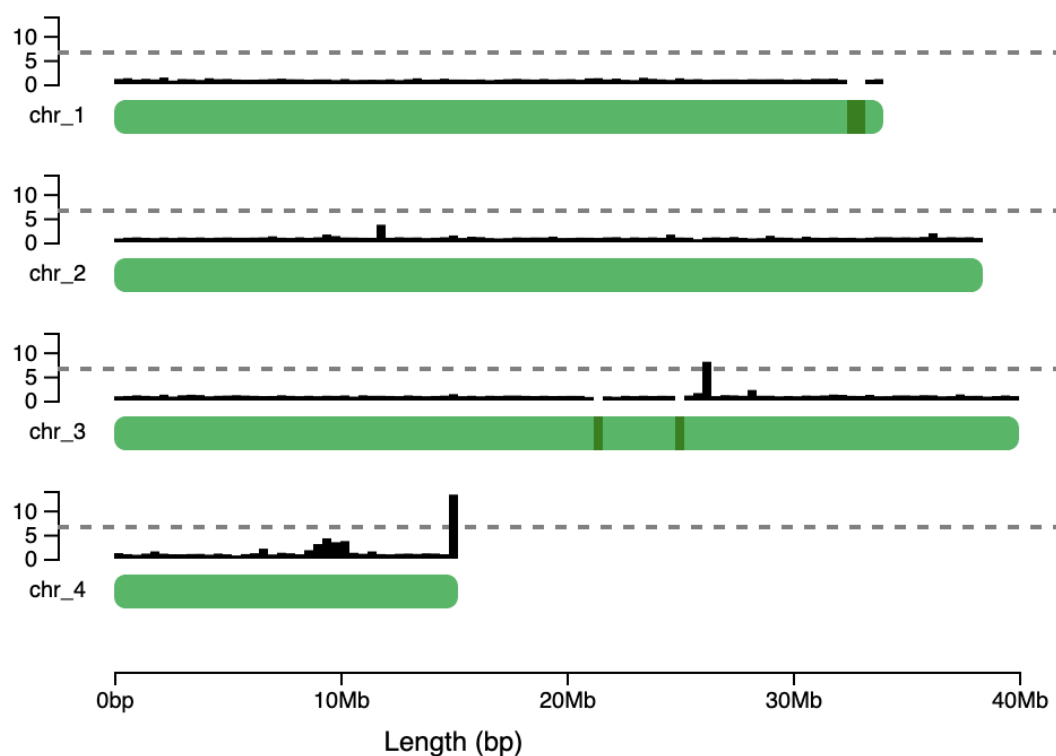


Рисунок 15 – Участки хромосом с генами белков с высокой индукцией при моделировании ангидробิโอ́за в клетках Pv11

Было выявлено, что идентифицированные в протеоме клеток Pv11 белки соответствуют генам *P. vanderplanki*, расположенным на всех 4 хромосомах. В графике на рисунке 14 изображена схема хромосом, по оси x отмечено количество пар оснований, а над хромосомами указана гистограмма, отражающая усреднённое изменение экспрессии белков, гены которых расположены в соответствующих участках хромосом. На четвертой хромосоме наблюдается несколько кластеров генов, чьи белки значительно повышают свою экспрессию при индукции ангидробิโอ́за. Также такие кластеры были обнаружены на второй и третьей хромосомах.

3.4 Анализ функционального обогащения генов

Для выявления метаболических путей, которые активируются при индукции ангидробิโอ́за, был выполнен анализ обогащения белков по функциональной

принадлежности с использованием пакета fgsea. Белкам *P. vanderplanki* были присвоены KEGG аннотации с использованием сервиса BLAST Koala, функциональная принадлежность белков к тому или иному процессу также оценивалась по данным KEGG. При аннотации белков, использовали их последовательности из текущей геномной сборки *P. vanderplanki*. Процессы с менее чем тремя аннотированными белками не анализировались.

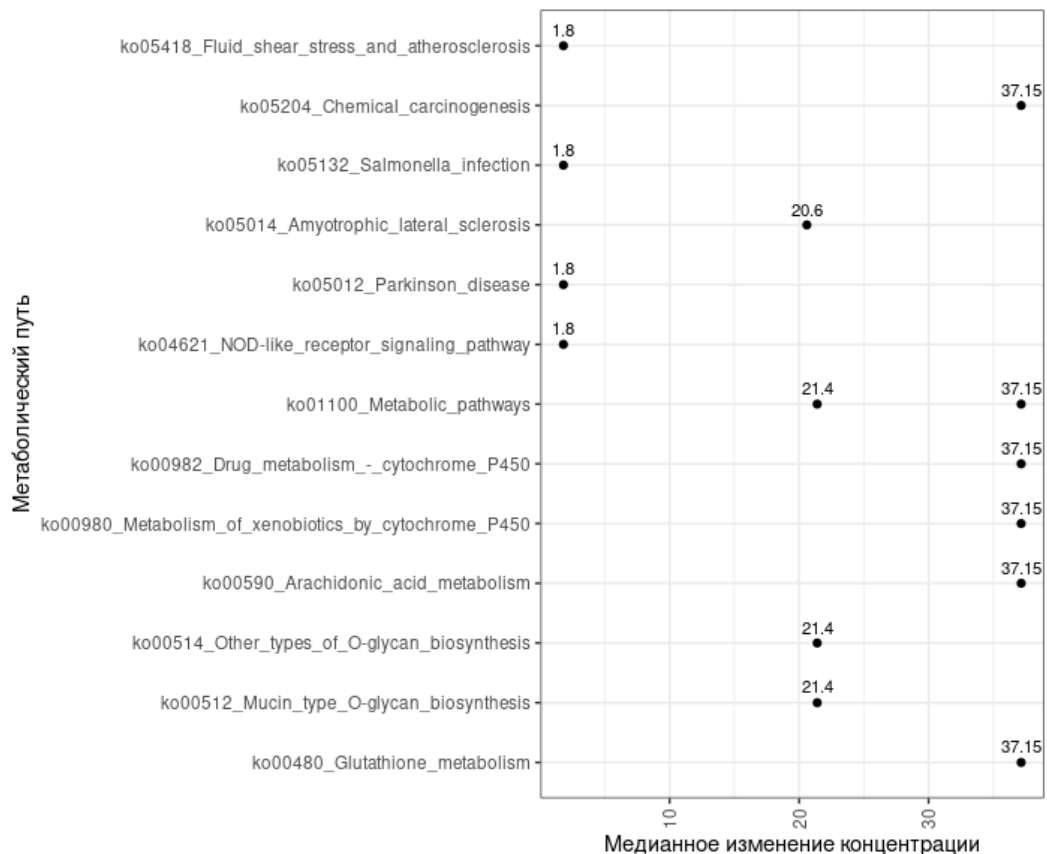


Рисунок 16 – Анализ функционального обогащения генов при моделировании индукции ангидаптобиоза в клетках Pv11

По оси x отложена медиана изменения концентрации для каждого из метаболических путей по KEGG, представленных на оси y. Одни и те же наборы генов имеют несколько типов KEGG аннотаций ввиду их участия в нескольких функциональных категориях KEGG.

Было выделено 13 метаболических путей, гены которых статистически значимо повышали экспрессию при моделировании ангидаптобиоза в клетках Pv11.

Метаболические пути, гены которых при индукции ангидробии экспрессию не повышали были отсеяны, так как не представляли интереса для изучения. Некоторые наборы белков относились сразу к нескольким метаболическим путям, всего было выделено 4 уникальных набора белков. Медиана изменения экспрессии этих групп оказалась равной 1.8, 20.6, 21.4 и 37.15. Результаты исследования суммированы на графике (рисунок 15).

Наибольшее изменение экспрессии было характерно для белков метаболизма глутатиона, арахидоновой кислоты, пути цитохрома р450. Почти двухкратное увеличение экспрессии также было показано для сигнального пути NOD-подобного рецептора, белки которого также участвуют в развитии болезни паркинсона и канцерогенезе. Таким образом, были выявлены метаболические пути, которые значимо повышают экспрессию при высушивании клеток *P. vanderplanki*.

ВЫВОДЫ

- 1) Данные протеома клеток Pv11 при моделировании ангидробิโอ́за подтверждают индукцию на уровне белка специфических для *P. vanderplanki* групп генов (LEA, метилтрансфераз, тиоредоксинов) и эффекторов антиоксидантной системы. Несоответствие между данными протеома и транскриптома обнаружено для четырёх LEA-белков (LEA7, LEA4, LEA18 и LEA10), SOD-5 и TRX-R.
- 2) Выявлены метаболические пути, индуцируемые на уровне белков при моделировании ангидробิโอ́за в клетках Pv11, в том числе – путь метаболизма ксенобиотиков цитохрома P450 и сигнальный путь NOD-подобных рецепторов.
- 3) Обнаружено, что гены белков, индуцируемых при моделировании ангидробิโอ́за в клетках Pv11, располагаются преимущественно в трёх геномных локусах на третьей и четвёртой хромосомах.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АФК – активные формы кислорода
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- ЭТЦ – электронтранспортная цепь
- GRAVY – (grand average of hydropathy) общее среднее значение гидропатии
- GSEA – Gene Set Enrichment Analysis
- HSP – heat shock proteins (белки теплового шока)
- IDP – внутренне неупорядоченные протеины
- LEA – late embryogenesis abundant, белок (белки) позднего эмбриогенеза
- PIMT – Protein-L-isoaspartate-O-methyltransferase
- qRT-PCR – Quantitative real-time PCR
- TDP – неупорядоченные белки тихоходок (tardigrade-specific intrinsically disordered proteins)
- TREN – трегалаза
- TRET1 – транспортер трегалозы-1
- TPP – трегалозо-6-фосфат фосфатаза
- TPS – трегалозо-6-фосфат синтаза

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1) **Alpert P.** The limits and frontiers of desiccation-tolerant life // Integr. Comp. Biol. – 2005. –V. 45. – № 5. – P. 685–695.
- 2) **Avelange-Macherel M.H.** Decoding the divergent subcellular location of two highly similar paralogous LEA proteins // Int. J. Mol. Sci. – 2018. –V. 19. – № 6.
- 3) **Boothby T.C.** Tardigrades Use Intrinsically Disordered Proteins to Survive Desiccation // Mol. Cell – 2017. –V. 65. – № 6. – P. 975- 984.e5.
- 4) **Boothby T.C.** Mechanisms and evolution of resistance to environmental extremes in animals // Evodevo – 2019. –V. 10. – № 1. – P. 1–12.
- 5) **Boswell L.C.** Group 3 late embryogenesis abundant proteins from embryos of *Artemia franciscana*: Structural properties and protective abilities during desiccation // Physiol. Biochem. Zool. – 2014. –V. 87. – № 5. – P. 640–651.
- 6) **Cornette R.** The induction of anhydrobiosis in the sleeping chironomid: Current status of our knowledge // IUBMB Life – 2011. –V. 63. – № 6. – P. 419–429.
- 7) **Crowe J.H.** Anhydrobiosis: An unsolved problem // Plant, Cell Environ. – 2014. T. 37. № 7. C. 1491–1493.
- 8) **Deviatiiarov R.** Diversity and regulation of S-adenosylmethionine dependent methyltransferases in the anhydrobiotic midge // Insects – 2020. –V. 11. – № 9. – P. 1–11.
- 9) **Dupont S.** Survival kit of *Saccharomyces cerevisiae* for anhydrobiosis // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2014. T. 98. № 21. C. 8821–8834.
- 10) **Erkut C.** Trehalose renders the dauer larva of *Caenorhabditis elegans* resistant to extreme desiccation // Curr. Biol. – 2011. –V. 21. – № 15. – P. 1331–1336.
- 11) **Erkut C.** Molecular strategies of the *Caenorhabditis elegans* dauer larva to survive extreme desiccation // PLoS One – 2013. –V. 8. – № 12. – P. 1–19.
- 12) **França M.B.** Oxidative stress and its effects during dehydration // Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol. – 2007. –V. 146. – № 4. – P. 621–631.
- 13) **Fredrickson J.K.** Protein oxidation: Key to bacterial desiccation resistance? // ISME J. – 2008. –V. 2. – № 4. – P. 393–403.

- 14) **Fu Z.** Detoxification-related gene expression accompanies anhydrobiosis in the foliar nematode (*Aphelenchoides fragariae*) // J. Nematol. – 2020. –V. 52.
- 15) **Furuki T.** A LEA model peptide protects the function of a red fluorescent protein in the dry state // Biochem. Biophys. Reports – 2019. –V. 17. – № September 2018. – P. 27–31.
- 16) **Gade V.R.** C. elegans possess a general program to enter cryptobiosis that allows dauer larvae to survive different kinds of abiotic stress // Sci. Rep. – 2020. –V. 10. – № 1.
- 17) **García A.H.** Anhydrobiosis in bacteria: From physiology to applications // J. Biosci. – 2011. T. 36. № 5. C. 939–950.
- 18) **Gatto L.** Visualization of proteomics data using R and Bioconductor // Proteomics. – 2015. T. 15. № 8. C. 1375–1389.
- 19) **Gusev O.** Comparative genome sequencing reveals genomic signature of extreme desiccation tolerance in the anhydrobiotic midge // Nat. Commun. – 2014. –V. 5.
- 20) **Hand S.C.** Insights from the brine shrimp *Artemia franciscana* // – 2016. –V. 242. – № 2. – P. 379–388.
- 21) **Hand S.C.** Molecular approaches for improving desiccation tolerance: insights from the brine shrimp *Artemia franciscana* // Planta – 2015. –V. 242. – № 2. – P. 379–388.
- 22) **Hatanaka R.** Diversity of the expression profiles of late embryogenesis abundant (LEA) protein encoding genes in the anhydrobiotic midge *Polypedilum vanderplanki* // Planta – 2015. –V. 242. – № 2. – P. 451–459.
- 23) **Hespeels B.** 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. –V. 10. – № 7. – P. 1–23.
- 24) **Hibshman J.D.** Mechanisms of Desiccation Tolerance: Themes and Variations in Brine Shrimp, Roundworms, and Tardigrades // Front. Physiol. – 2020. T. 11.
- 25) **Hoekstra F.A.** Mechanisms of Plant desiccation tolerance // Trends Plant Sci. – 2001.
- 26) **Jonsson K.I.** Trehalose in Three Species of Desiccation Tolerant

- Tardigrades~!2009-10-14~!2010-01-29~!2010-04-21~! // Open Zool. J. – 2010. –V. 3. – № 1. – P. 1–5.
- 27) **Kanehisa M.** BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences // J. Mol. Biol. – 2016. –V. 428. – № 4. – P. 726–731.
- 28) **Khroustalyova G.** Anhydrobiosis in yeasts: Psychrotolerant yeasts are highly resistant to dehydration // Yeast – 2019. –V. 36. – № 5. – P. 375–379.
- 29) **Kikawada T.** Factors Inducing Successful Anhydrobiosis in the African Chironomid *Polypedilum vanderplanki*: Significance of the Larval Tubular Nest 1. , – 2005. 710–714 c.
- 30) **Kyte J.** A simple method for displaying the hydropathic character of a protein // J. Mol. Biol. – 1982. –V. 157. – № 1. – P. 105–132.
- 31) **Liu Y.** Transcriptome dynamics of *deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2003. –V. 100. – № 7. – P. 4191–4196.
- 32) **Madin K.A.C.** Anhydrobiosis in nematodes: Carbohydrate and lipid metabolism during dehydration // J. Exp. Zool. – 1975. –V. 193. – № 3. – P. 335–342.
- 33) **Marunde M.R.** Improved tolerance to salt and water stress in *Drosophila melanogaster* cells conferred by late embryogenesis abundant protein // J. Insect Physiol. – 2013. –V. 59. – № 4. – P. 377–386.
- 34) **Mazin P. V.** Cooption of heat shock regulatory system for anhydrobiosis in the sleeping chironomid *Polypedilum vanderplanki* // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2018. –V. 115. – № 10. – P. E2477–E2486.
- 35) **Mishra P.K.K.** PIMT-Mediated Protein Repair: Mechanism and Implications // Biochem. – 2019. –V. 84. – № 5. – P. 453–463.
- 36) **Moiset G.** Disaccharides impact the lateral organization of lipid membranes // J. Am. Chem. Soc. – 2014. –V. 136. – № 46. – P. 16167–16175.
- 37) **Nakahara Y.** Cells from an anhydrobiotic chironomid survive almost complete desiccation // Cryobiology – 2010. –V. 60. – № 2. – P. 138–146.
- 38) **Nesmelov A.** The antioxidant system in the anhydrobiotic midge as an essential,

adaptive mechanism for desiccation survival // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. : Springer New York LLC, – 2018. C. 259–270.

39) **Potts M.** Desiccation tolerance of prokaryotes: Application of principles to human cells // *Integr. Comp. Biol.* – 2005. –V. 45. – № 5. – P. 800–809.

40) **Rapoport A.** Anhydrobiosis: Inside yeast cells // *Biotechnol. Adv.* – 2019. –V. 37. – № 1. – P. 51–67.

41) **Ren Q.** Membrane and lipid metabolism plays an important role in desiccation resistance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *BMC Microbiol.* – 2020. –V. 20. – № 1.

42) **Sakurai M.** Vittrification is essential for anhydrobiosis in an African chironomid, *Polypedilum vanderplanki*. , – 2008.

43) **Sepulveda J.L.** Using R and Bioconductor in Clinical Genomics and Transcriptomics // *J. Mol. Diagnostics*. – 2020. T. 22. № 1. C. 3–20.

44) **Shaikhutdinov N.** Microbiota composition data of imago and larval stage of the anhydrobiotic midge // *Data Br.* – 2020. –V. 33.

45) **Sharon M.A.** Characterization of a group 1 late embryogenesis abundant protein in encysted embryos of the brine shrimp *Artemia franciscana* // *Biochem. Cell Biol.* – 2009. –V. 87. – № 2. – P. 415–430.

46) **Stiglic N.** Effects of screentime on the health and well-being of children and adolescents: A systematic review of reviews // *BMJ Open* – 2019. –V. 9. – № 1.

47) **Subramanian A.** Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2005. –V. 102. – № 43. – P. 15545–15550.

48) **Teets N.M.** Changes in energy reserves and gene expression elicited by freezing and supercooling in the antarctic midge, *Belgica antarctica* // *Insects* – 2020. –V. 11. – № 1. – P. 1–14.

49) **Vasilenko A.** Accumulation of Mn(II) in *Deinococcus radiodurans* Facilitates Gamma-Radiation Resistance // *Science* (80-.). – 2004. –V. 306. – № 5698. – P. 1025–1026.

50) **Voronina T.A.** New group of transmembrane proteins associated with desiccation

tolerance in the anhydrobiotic midge *Polypedilum vanderplanki* // *Sci. Rep.* – 2020. –V. 10. – № 1.

51) **Watanabe K.** 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. –V. 73. – № 1. – P. 93–98.

52) **Watanabe M.** Increase of internal ion concentration triggers trehalose synthesis associated with cryptobiosis in larvae of *Polypedilum vanderplanki* // *J. Exp. Biol.* – 2003. –V. 206. – № 13. – P. 2281–2286.

53) **Welnicz W.** Anhydrobiosis in tardigrades-The last decade // *J. Insect Physiol.* – 2011. T. 57. № 5. C. 577–583.

54) **Wojciechowska D.** Mitochondrial alternative oxidase contributes to successful tardigrade anhydrobiosis // *Front. Zool.* – 2021. –V. 18. – № 1. – P. 15.

55) **Wolkers W.F.** Human platelets loaded with trehalose survive freeze-drying // *Cryobiology* – 2001. –V. 42. – № 2. – P. 79–87.

56) **Wolkers W.F.** From anhydrobiosis to freeze-drying of eukaryotic cells. , – 2002. 535–543 c.