

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Уфимский федеральный исследовательский центр Российской
академии наук (УФИЦ РАН)**
**Институт биохимии и генетики - обособленное структурное
подразделение Федерального государственного бюджетного научного
учреждения Уфимского федерального исследовательского центра
Российской академии наук
(ИБГ УФИЦ РАН)**

На правах рукописи

ГУСЕВ ОЛЕГ АЛЕКСАНДРОВИЧ

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ
АНГИДРОБИОЗА В ОНТОГЕНЕЗЕ КОМАРОВ-ЗВОНЦОВ
РОДА *POLYPEDILUM* (*CHIRONOMIDAE, DIPTERA*)**

1.5.7. Генетика (биологические науки)

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Уфа–2026

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	9
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	24
1.1. Ангидробиоз как биологический феномен	24
1.2. История изучения феномена ангидробиоза	25
1.3. Распространение ангидробиоза в живом мире	28
1.3.1 Коловратки (<i>Rotifera</i>)	29
1.3.2. Тихоходки (<i>Tardigrada</i>)	32
1.3.3. Нематоды и иные представители meiofauna	34
1.3.4. Ракообразные (<i>Artemia</i>).....	37
1.3.5. Микроэукариоты (дрожжи)	40
1.3.6. Насекомые (включая двукрылых).....	43
1.4. Эволюционное значение ангидробиоза и его возможное практическое применение	44
1.4.1. Эволюционное значение	44
1.4.2. Прикладное значение и трансляционный потенциал ангидробиоза	46
1.5. Комары-звонцы рода <i>Polypedilum</i> как модель ангидробиоза .	47
1.5.1. Жизненный цикл, ареал обитания и механизмы личиночного ангидробиоза у <i>Polypedilum vanderplanki</i>	47
1.5.2. Морфология и толерантность к обезвоживанию у ангидробиотических видов <i>Polypedilum vanderplanki</i> и <i>P. pembai</i> в сравнении с типичным представителем рода <i>P. nubifer</i>	52
1.5.3. Значение <i>Polypedilum</i> как модельных объектов.....	53

1.6. Гипотеза экстремальной устойчивости <i>Polypedilum vanderplanki</i> в условиях ангидробиоза.....	54
1.6.1. Экстремальная кросс-устойчивость и гипотеза защиты ДНК	54
1.6.2. Роль трегалозы и восстановление энергетического обмена у <i>Polypedilum vanderplanki</i>	57
1.6.3. Молекулярная структура трегалозы	58
1.6.4. Роль трегалозы в запуске энергетического обмена	59
1.6.5. Восстановление цикла лимонной кислоты	60
1.6.6. Белки теплового шока: различия стресс-ответа при тепловом шоке и обезвоживании.	60
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	63
2.1. Объекты исследования.....	63
2.1.1. Личинки <i>Polypedilum vanderplanki</i> (создание и поддержание лабораторной колонии, инбридинг, условия содержания, голодание перед экспериментами).....	63
2.1.2. Клеточная линия Pv11 (условия культивирования, состав среды, пассирование, особенности ангидробиотической линии).....	63
2.2. Индукция стрессовых воздействий. Дегидратация и регидратация (протоколы ангидробиоза).	64
2.3. Физико-химические стрессоры	65
2.3.1. Ионизирующее излучение	65
2.3.2. Космическое излучение	65
2.3.3. Ультрафиолетовое космическое излучение.....	66
2.3.4. Двуцепочечные разрывы ДНК	66

2.3.5. Гиперосмотический стресс	66
2.3.6. Трегалоза.	67
2.3.7. Окислительный стресс (паракват)	67
2.3.8. Тепловой шок.....	67
2.4. Выделение и подготовка биоматериала	67
2.4.1. Экстракция ДНК у личинок <i>Polypedilum vanderplanki</i> клеток линии Pv11	67
2.4.2. Выделение РНК у личинок <i>Polypedilum vanderplanki</i> клеток линии Pv11	68
2.4.3. Получение образцов для белкового и метаболомного анализа.....	69
2.4.4. Подготовка образцов для измерения антиоксидантной активности личинок <i>P. vanderplanki</i>	70
2.4.5. Трансфекция клеток Pv11	70
2.5. Геномный анализ	71
2.5.1. Подготовка библиотек и секвенирование	71
2.5.2. Сборка и улучшение генома.....	71
2.5.3. Оценка полноты и качества.....	72
2.5.4. Аннотация генома, фильтрация повторных последовательностей и предсказание генов.....	72
2.5.5. Источники данных и подготовка внешних наборов для сравнительной геномики	73
2.5.6. GO-анализ и обогащение функциональных категорий	73
2.6. Транскриптомный анализ	74
2.6.1. RNA-seq (Illumina).....	74

2.6.2. Дополнительные методы: CAGE-seq, CTR-seq для уточнения транскрипционных стартов и промоторов.....	74
2.7. Метаболомный анализ и интеграция с транскриптомикой (база KEGG, BLASTp).....	76
2.8. Функциональная генетика и клеточная биология.....	79
2.8.1. Анализ локализации рекомбинантных белков (конфокальная микроскопия)	79
2.8.2. Характеристика и тестирование промоторов (MidgeBase, люцифераза, SEAP).....	80
2.9. Анализ антиоксидантной активности.....	81
2.10. Биоинформационическая обработка данных	84
2.10.1. Контроль качества, мэппинг и подсчёт транскриптов ...	84
2.10.2. Кластеризация генов, ортологический анализ	85
2.10.3. GO-анализ, KEGG-аннотация	85
2.11. Статистический анализ	86
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	87
3.1. Исследование устойчивости личинок <i>Polypedilum</i> к факторам космической среды	87
3.1.1. Выживаемость личинок после космического полёта	87
3.1.2. Радиационная устойчивость в условиях «сухого» и «влажного» состояния	90
3.1.3. Повреждения и защита ДНК при ангидробиозе и радиации	93
3.1.4. Заключение к разделу.....	100

3.2. Расшифровка генома <i>Polypedilum vanderplanki</i> и характеристики генома.....	102
3.2.1. Общие черты геномной организации <i>Polypedilum</i>	102
3.2.2. Хромосомная организация: кариотип, политетные карты и «особая роль» 4-й хромосомы	103
3.2.3. Паралогизация «защитных» генов, семейство РИМТ и межвидовые различия.....	106
3.2.4. Размер генома у хирономид, инtronная компактность..	108
3.2.5. Митохондриальный геном: состав и возможные следы адаптации	108
3.2.6. Заключение к разделу.....	109
3.3. Кластеризация и амплификация генов как элемент адаптации к ангидробиозу	110
3.3.1. Геномные кластеры и архитектура ангидробиоз-ассоциированных генов у <i>Polypedilum</i>	110
3.3.2. Паралогическое разнообразие и экспрессия LEA-белков	118
3.3.3. Новая группа трансмембранных генов <i>LIL</i> и их связь с LEA-кластером	122
3.3.4. Заключение к разделу.....	130
3.4. Полногеномный анализ экспрессии генов	132
3.4.1. Глобальная динамика экспрессии и регуляторная архитектура ангидробиоза	132
3.4.2. Эффекторные модули ангидробиоза: «ядро» генов и процессы	135

3.4.3. Регуляция репаративных путей и контроль геномной целостности в условиях десикации и регидратации	139
3.4.4. Заключение к разделу.....	142
3.5. HSF-центрическая регуляция ангидробиоза и индукция белков теплового шока у <i>Polypedilum vanderplanki</i>	143
3.5.1 Экспрессионная характеристика Hsf и семейств Hsp при дегидратации и регидратации у <i>Polypedilum vanderplanki</i> (временные профили, фазовая специфика)	143
3.5.2. Регуляторная архитектура HSF: обогащение мотивов в промоторах десикационно-индуцируемых генов и признаки авторегуляции.....	149
3.5.3. Функциональная роль HSF: данные, полученные на клеточной культуре Pv11	156
3.5.4. Заключение к разделу.....	158
3.6. Метаболический перезапуск при ангидробиозе и трегалозный резерв.....	160
3.6.1. Заключение к разделу.....	166
3.7. Биотехнологический потенциал клеточной линии Pv11: сухое хранение ферментов, промоторные системы и геномное редактирование для ангидробиоза	168
3.7.1. Доказательство принципа «сухого» хранения биоактивных белков на Pv11	168
3.7.2. Промоторная архитектура Pv11 для высокоуровневой и кросс-линейной экспрессии (промотор 121/Pv.00443)	173
3.7.3. Управляемая экспрессия генов в системе Tet-On на основе минимального промотора	183

3.7.4. Геномная модификация клеток Pv11 и стабильная интеграция экспрессионных конструкций	188
3.7.5. Заключение к разделу.....	195
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	198
ВЫВОДЫ	202
БЛАГОДАРНОСТИ	205
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	206
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	210

ВВЕДЕНИЕ

Способность организмов переходить во временное аметаболическое состояние — ангидробиоз, обеспечивает выживание при практически полном отсутствии воды и кислорода, а также при прекращении поступления энергии из внешней среды. Данное состояние рассматривается как одна из наиболее радикальных форм физиологической пластичности, поскольку временно консервирует клеточные структуры и функции при отсутствии заметного метаболического обмена (Watanabe et al., 2006).

Феномен ангидробиоза широко представлен в растительном мире (семена), а также в микробных сообществах (споры и цисты). У многоклеточных животных эукариот ангидробиоз представлен сравнительно редко, что делает такие модели особенно ценными для изучения фундаментальных пределов жизнеспособности.

Растения традиционно рассматриваются как модельная система для анализа устойчивости к обезвоживанию. Исследования семян и тканей взрослых растений позволили выделить несколько ключевых элементов, обеспечивающих адаптацию к полному обезвоживанию (Atkin et al., 2009). К ним относятся: накопление совместимых осмоловитов, формирование стеклообразного состояния цитоплазмы, стабилизация мембран и белков, а также перестройка антиоксидантной системы. Особую роль играют белки семейства LEA, впервые описанные в семенах и обладающие внутренней неупорядоченностью. Эти белки формируют гидрофильную матрицу, предотвращающую агрегацию макромолекул при низкой активности воды (Hand et al., 2011; Amara et al., 2014). Их действие тесно связано с сахарной компонентой — в частности, сахароза и раффинозные олигосахариды способны замещать воду в гидратных оболочках биополимеров и участвует в формировании витрифицированной фазы, которые сохраняют нативную

конфигурацию белков и целостности липидных структур, а также обеспечивают быстрое восстановление функций после регидратации.

У беспозвоночных ангидробиоз реализуется в нескольких эволюционных стратегиях. У ряда видов он встроен в жизненный цикл и соответствует определённой стадии развития (например, эфиопии и покоящиеся яйца у некоторых ракообразных) (Brendonck et al., 2003; Bright et al., 2015). У других таксонов состояние обезвоживания возможно на протяжении всего жизненного цикла — к таким организмам относятся нематоды, коловратки и тихоходки (Wharton et al., 2015; Neumann et, 2009). У третьей группы ангидробиоз индуцируется специфическими сигналами и связан с определёнными фазами онтогенеза, как, например, у личинок комара-звонца *Polypedilum vanderplanki*, где устойчивость к обезвоживанию обратима и индуцируема (Neuman et al., 2006; Watanabe et al., 2006). Разнообразие стратегий указывает на существование общих физико-химических принципов стабилизации биологических структур при множестве молекулярных механизмов, возникших в результате конвергентной эволюции.

Сходство молекулярных механизмов устойчивости к обезвоживанию у растений и беспозвоночных подтверждено на геномном уровне. Установлено, что некоторые животные ангидробионты обладают расширенными семействами генов, функционально эквивалентных классическим растительным участникам ответов на высыхание. К числу таких компонентов относятся белки семейства LEA и элементы метаболизма трегалозы (Hand et al., 2013; Yoshida et al., 2022). Эти данные подтверждают, что толерантность к ангидробиозу обеспечивается не только наличием отдельных защитных молекул, но и согласованной регуляцией целых молекулярных сетей, способствующих переходу клетки в физически устойчивое состояние с минимальной остаточной активностью. Основу этого состояния составляют принципы водозамещения, витрификации

цитоплазмы и ограниченного упорядочения внутренних поверхностей биополимеров, что позволяет стабилизировать белки, мембранны и нуклеиновые кислоты при отсутствии воды.

Современное понимание ангидробиоза у животных включает несколько взаимодополняющих этапов. На физико-химическом уровне формируется стеклообразная матрица, фиксирующая макромолекулы в пределах допустимых конформационных колебаний. На молекулярном уровне функционируют гидрофильные неупорядоченные белки, малые шапероны, сахара и полиолы, обеспечивающие стабилизацию белков и липидных бислоев. На клеточном уровне активируются антиоксидантная защита и механизмы репарации повреждений, возникающих при высыхании и регидратации. На уровне регуляции экспрессии включаются молекулярные «переключатели», запускающие программы сворачивания метаболизма и синтеза защитных компонентов. Эти уровни формируют архитектуру устойчивости к условиям экстремально низкой активности воды, в которой могут реализовываться эффекты кросс-устойчивости к другим видам абиотического стресса. Для криптофагических беспозвоночных описана повышенная устойчивость к ионизирующему излучению, вакууму, экстремальным температурам и окислительному стрессу (Crowe et al., 1992; Gladyshev et al., 2008). Предполагается, что кросс-устойчивость обусловлена общей физической стабилизацией, ограниченным метаболизмом и усиленным контролем за повреждением макромолекул.

Личинки *Polypedilum vanderplanki* являются уникальной моделью изучения ангидробиоза среди насекомых. До нашего исследования толерантность к полному обезвоживанию зафиксирована лишь у одного вида из более чем ста, входящих в данный род. Популяции *P. vanderplanki* обитают на северной периферии пустыни Сахара, где формируются временные водоёмы, пересыхающие в засушливый сезон. В природных

условиях личинки выживают после многомесячной, а иногда и многолетней сухой консервации, восстанавливая физиологическую активность в течение нескольких десятков минут после регидратации. При этом они демонстрируют устойчивость к широкому спектру абиотических факторов, включая ионизирующее излучение, вакуум и экстремальные температуры (Cornette et al., 2011), что свидетельствует о наличии скоординированных молекулярных программ, обеспечивающих переход в стабилизированное обезвоженное состояние и выход из него.

Несмотря на значительный прогресс, молекулярно-генетическая природа устойчивости к обезвоживанию у насекомых долгое время оставалась недостаточно изученной. Оставались неясными геномные основы возникновения ангидробиоза, происхождение и эволюция LEA белков и других уникальных генов связанных с ангидробиозом у *P. vanderplanki*, организация соответствующих локусов и их регуляторных контуров. Недостаточно охарактеризованы транскриптомные сценарии входа в ангидробиоз и регидратации, а также вклад различных классов LEA и ферментов трегалозного пути в общую толерантность клетки. Требовалось установить механизмы координации метаболического замедления и консервации, антиоксидантной защиты и структурной поддержки хроматина. Необходимым являлось сравнение с растительными системами и другими беспозвоночными, а также выявление уникальных насекомых специфических модулей, сформировавшихся на основе ранее существующих стрессовых программ.

Особое значение имеют регуляторные аспекты. Переход к ангидробиозу требует быстрого и согласованного изменения экспрессии множества генов. Предполагается участие транскрипционных факторов, чувствительных к осмотическим и энергетическим сигналам, а также механизмов эпигенетической памяти, обеспечивающих повторяемость адаптивных ответов. Вероятна роль малых РНК и посттранскрипционных

регуляторов, тонко настраивающих временные параметры экспрессии защитных белков. Не исключается участие сенсорных контуров, связанных с кальциевым гомеостазом, функционированием митохондрий и регуляцией окислительно-восстановительных процессов. Эти гипотезы требуют экспериментальной проверки с использованием интегративных подходов, сочетающих геномный и транскриптомный анализ с функциональными исследованиями.

Значимым направлением исследований является установление связи между молекулярными механизмами и фенотипическими проявлениями, ассоциированными с ангидробиозом. Анализ влияния состава и организации семейств LEA белков и ферментов трегалозного пути на скорость входа в ангидробиоз и полноту восстановления после регидратации необходим для построения обоснованной модели. Сравнение с филогенетически близкими видами, не демонстрирующими ангидробиоз, позволяет выделить универсальные и специфические компоненты защитной программы. Аналогичный подход применим к анализу кросс-устойчивости, что способствует выявлению ключевых узлов регуляторной сети и формированию основ для биотехнологического применения.

Прикладной интерес к феномену ангидробиоза обусловлен возможностью создания технологий безводного хранения биологических объектов — белков, клеток, тканей. Перспективны разработки стабильных сухих форм вакцин и диагностических средств, а также методов хранения биологического материала в условиях ограниченной инфраструктуры. Способность личинок *P. vanderplanki* переносить обратимое обезвоживание без потери функциональности сложных тканей подчёркивает потенциал применения идентифицированных молекулярных и регуляторных компонентов в инженерных решениях. При этом фундаментальные аспекты остаются приоритетными, так как именно они определяют пределы устойчивости и возможности воспроизведения феномена.

Настоящая работа направлена на изучение молекулярных и генетических основ ангидробиоза у *P. vanderplanki* с применением методов полногеномного анализа и ряда пост-геномных валидационных методов. В её рамках проводился анализ репертуара защитных белков и ферментов метаболических путей, исследование транскриптомной динамики на ключевых этапах обезвоживания и регидратации, а также реконструкция регуляторных контуров, координирующих вход и выход из амебиологического состояния. Дополнительно рассматриваются проявления кросс-устойчивости и их связь с основными защитными механизмами. Сопоставление с другими беспозвоночными и растительными системами позволяет оценить степень конвергентности и выявить специфические для насекомых решения. Совокупность этих шагов формирует основу для построения интегративной модели ангидробиоза и обозначает направления дальнейших экспериментальных исследований.

В соответствии с этим была сформулирована цель данной работы: исследовать геномные механизмы происхождения и молекулярно-генетические особенности ангидробиоза у комаров звонцов рода *Polypedilum*.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Исследовать взаимосвязь устойчивости личинок к обезвоживанию и высоким дозам радиации с состоянием ядерной ДНК и активностью генов в личинках хирономид.
2. Изучить структуру генома комаров звонцов и выделить особенности вида *P. vanderplanki* связанные с зарождением и эволюцией ангидробиоза.
3. Исследовать особенности защитных генов *P. vanderplanki*, обеспечивающих толерантность к полному обезвоживанию.

4. Разработать геномные методы для изучения ангидробиоза *in vitro* с применением клеточной культуры, полученной из *P. vanderplanki*.

5. Проанализировать взаимосвязь полногеномного профиля динамики РНК, белков и метаболитов необходимых для выживания личинок *P. vanderplanki* в условиях полного обезвоживания.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Цикл ангидробиоза в личинках комара-звонца *P. vanderplanki* сопровождается массовыми двухцепочечными разрывами ДНК.

2. Повышенная устойчивость *P. vanderplanki* к высоким дозам ионизирующей радиации является одним из результатом эволюции защитных механизмов, связанных с регулярной фрагментацией ядерной ДНК в цикле обезвоживания-регистратации.

3. Геном *P. vanderplanki* претерпел значительные изменения связанные с адаптацией к циклам обезвоживания-регистратации за счет изменения базовых характеристик, включая AT/GC состав и количества мобильных элементов генома.

4. Эволюция генома *P. vanderplanki* связана с формированием особых участков генома, содержащих новые гены, продукты которых обеспечивают защиту от негативных эффектов обезвоживания.

5. Наблюдается значительная гетерогенность в характеристиках хромосом *P. vanderplanki*. Хромосома IV является ключевой для появления и эволюции генов связанных с ангидробиозом.

6. Два основных механизма формирования комплекса ключевых генов обеспечивающих толерантность личинок *P. vanderplanki* к обезвоживанию – это горизонтальный перенос генов с последующей паралогизацией, и формирование кластеров паралогов генов белков теплового шока, антиоксидантой защиты и других ключевых участников клеточного ответа.

7. Новые гены связанные с ангидробиозом в *P. vanderplanki* претерпели значительную радиацию в плане внутриклеточной локализации их белковых продуктов, биохимических и структурных особенностей.

8. Первые этапы восстановления активности личинок в процессе регидратации основываются на биохимических процессах, с использованием белков и метаболитов, накопленных в процессе обезвоживания.

9. С применением высокоэффективных промоторов *P. vanderplanki* и адаптированных протоколов геномного редактирования разработан функциональный инструментарий для изучения механизмов ангидробиоза *in vitro*.

Научная новизна

В данной работе с использованием комплекса современных методов анализа транскриптомных и метаболомных профилей, а также с использованием подходов сборки и аннотации геномов, поддержанных сериями *in vitro* валидационных экспериментов сделан ряд приоритетных наблюдений. На основе уникального эксперимента в открытом космическом пространстве и блока лабораторных работ продемонстрировано что личинки насекомых в состоянии ангидробиоза способны выживать, сохраняя репродуктивный потенциал в течении длительного периода времени в условиях космического вакуума и других факторов космического полета. Впервые показано, что каждый цикл ангидробиоза в личинках комара-звонца сопряжен с массивными повреждениями ядерной ДНК, reparация которых занимает несколько дней после регидратации. Такой длительный процесс нестабильности ядерной ДНК в цикле обезвоживания-регидратации ассоциирован с

выработкой особого адаптивного механизма, связанного с адаптивным синтезом защитных соединений в процессе высыхания личинок, что позволяет минимизировать негативный эффект от фрагментации ДНК. Впервые секвенированы, собраны до уровня хромосом и проаннотированы геномы ангидробиотических и референсных комаров-звонцов, что позволило выяснить, что комплекс защитных белков необходимых для ангидробиоза появился на основе нескольких механизмов, включая горизонтальный перенос генов, а также формирования в геноме особых регионов, с высокой концентрацией паралогов защитных генов. Впервые было показано, что геномная эволюция связанная с ангидробиозом проходила за появления особых характеристик одной из хромосом на которой и сконцентрированы парalogизированные гены, связанные с ответом на обезвоживание. На основе комплекса *in silico* и *in vitro* подходов впервые было показано, что паралоги защитных генов эволюционировали в сторону специализации непосредственно связанной с ангидробиозом, включая биохимическую активность и внутриклеточную локализацию. Впервые, на основе комплексного мульти-омиксного подхода показано, что у *P. vanderplanki* существует особый комплекс метаболитов, активно приминающий участие в защите от негативных эффектов обезвоживания.

Кроме того, был разработан и адаптирован ряд новых протоколов для генетической модификации единственной в мире ангидробиотической клеточной культуры Pv11 и экспрессионных системах для получения рекомбинантных белков на ее основе.

Научная и практическая значимость

Исследования феномена ангидробиоза, помимо фундаментального интереса, имеют прямое прикладное значение, формируя научно-технический задел для развития технологий сухого хранения живых клеток

и тканей без использования заморозки. Данное направление рассматривается как одно из наиболее перспективных в биомедицине и биотехнологии, поскольку открывает возможность создания стабильных биологических систем, не зависящих от постоянного поддержания низких температур. Снижение зависимости биобанков, исследовательских коллекций и транспортных систем от криогенных условий существенно расширяет возможности для медицинской, фармацевтической и полевой биологической практики.

Результаты настоящего исследования, основанные в том числе на изучении уникальной клеточной линии *Pv11*, полученной из тканей *Polypedilum vanderplanki*, обладают особой практической ценностью. Эта линия сохраняет жизнеспособность и пролиферативный потенциал после длительного сухого хранения, что делает её моделью для разработки технологий безводной консервации клеток млекопитающих и других организмов. Анализ транскриптомных и протеомных особенностей *Pv11* позволяет выявлять природные комбинации защитных белков и метаболитов, обеспечивающих сохранение клеточной структуры и функций в обезвоженном состоянии. На основе этих данных формируются принципы биомиметического подбора защитных веществ — аминокислот, сахаров, полимеров и белков класса LEA — для применения в системах хранения и транспортировки биологического материала без потери жизнеспособности.

Практическое значение работы также заключается в получении новых регуляторных элементов для молекулярной биотехнологии. В ходе анализа генома *P. vanderplanki* были идентифицированы высокоэффективные промоторные последовательности, активные в различных физиологических состояниях клетки. Показано, что их активность превосходит типовые промоторы, используемые в конструкциях на основе *Drosophila melanogaster*, применяемых в системах

экспрессии рекомбинантных белков. Эти элементы представляют интерес для создания универсальных векторных систем с повышенной стабильностью экспрессии в условиях стрессовых воздействий.

Таким образом, результаты исследования формируют основу для новых биотехнологических решений в области безводного хранения биоматериалов, оптимизации экспрессии рекомбинантных белков, а также для создания биоинспирированных систем стабилизации клеток и макромолекул. Практическая реализация этих направлений способна существенно сократить энергетические затраты на хранение и транспортировку биологических образцов и расширить диапазон применений живых клеток в медицине, фармакологии, сельском хозяйстве и космических биотехнологиях.

Методология и методы исследования.

Использованные в работе методы соответствуют общей концепции диссертационного исследования и обеспечивают сопоставимость результатов, полученных на уровнях генома, транскриптома, метаболома и функциональной валидации. Начальный этап включал поиск, сбор и анализ литературных данных по анgidробиозу и моделям рода *Polypedilum*, с формированием теоретической рамки и постановкой задач исследования. В основе экспериментального методологического подхода лежала интеграция современных методов *in silico* и *in vivo*, а также *in vitro* анализа. В качестве объектов использовали личинок *Polypedilum vanderplanki* и анgidробиотическую клеточную линию Pv11, дополнительно привлекали *Polypedilum nubifer* для сопоставительного контроля. Экспериментальная часть включала воспроизводимые протоколы дегидратации и регидратации у личинок и клеток Pv11, основанные на стандартизованных схемах подготовки и высушивания, а также нагрузочные модели окислительного

стресса и теплового шока для анализа перекрёстной устойчивости и разнесения стресс ответов (Watanabe et al., 2002; Watanabe et al., 2019). Геномный блок включал секвенирование и de novo сборку с использованием платформ Illumina и PacBio и последующую структурную и функциональную аннотацию. Транскриптомный анализ выполняли методом RNA seq с контролем качества РНК, картированием чтений на хромосомную сборку и оценкой дифференциальной экспрессии с последующей функциональной интерпретацией по GO. Метаболомный блок включал аннотирование метаболитов, статистическую обработку в MetaboAnalyst и реконструкцию путей на основе KEGG с интеграцией с транскриптомными данными. Для функциональной валидации в системе Pv11 применяли трансфекцию с использованием NEPA21 и анализ внутриклеточной локализации рекомбинантных белков методом лазерной конфокальной микроскопии, также оценивали антиоксидантную активность в динамике обезвоживания и регидратации.

Степень достоверности и апробация результатов.

Полученные результаты обеспечивается применением современных экспериментальных и вычислительных методов, проведением достаточного числа валидационных экспериментов и контрольных анализов. Теоретическое обоснование выводов подкреплено сравнительным анализом данных, опубликованных в отечественной и зарубежной литературе. Надёжность и научная значимость работы дополнительно подтверждаются публикацией основных результатов исследования в ведущих рецензируемых научных журналах, а также их обсуждением на профильных международных конференциях. Результаты работы были представлены на следующих международных и российских конференциях, семинарах и научно-практических школах в формате приглашенных

докладов: Форум Будущих Технологий, Москва, Россия, 13-14 февраля, 2024; Научно-практический семинар “Mechanisms of Hibernation”, Окинава, Япония, 14-15 января, 2024; 2023 Physiological Research School, Оказаки, Япония, 9-10 ноября, 2023; Всероссийская школа-конференция “Клеточные и Геномные Технологии для Совершенствования Сельскохозяйственных Животных”, Пушкин, Россия, 26-27 июня, 2023; Курчатовский Геномный Форум, Москва, Россия, 17-20 октября, 2023; Конгресс Молодых Ученых, Сочи, Россия, 28-30 ноября 2023; EMBO Workshop ‘Trans-Scale Biology’ Using Exotic Non-model Organisms, Оказаки, Япония, 25-28 июля, 2023; The 9th International Workshop on X-Ray CT Visualization for Socio-Cultural Engineering & Environmental Materials, Кумамото, Япония, 6-7 декабря, 2022; Молодежная конференция “Генетические и Радиационные Технологии в Сельском Хозяйстве”, Обнинск, Россия, 18–21 октября, 2022; OZ Single Cell 2022, Голд Кост, Австралия, 14-16 сентября, 2022; BGRS/SB-2022: 13th International Multiconference “Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology, Новосибирск, Россия, 4-8 июля, 2022; Laser Solutions for Space and the Earth 2022 (LSSE2022), Йокогама, Япония, 18-22 апреля, 2022; 4th Hibernation and Dormancy Research Workshop, Хоккайдо, Япония, 4-5 февраля, 2022; IV Научно-Практическая Школа “”Анализ отдельных клеток”, Томск, Россия, 25-28 августа, 2022; Engineering Network Workshop “Fusion Of Biological Resistance Functions and Engineering”, Токио, Япония, 26 февраля, 2019; MBSJ-2018: Biology of Intriguing Animals Symposium, Йокогама, Япония, 27-28 ноября, 2018; Конгресс CRISPR-2018, Новосибирск, Россия, 10-14 сентября, 2018; Biothermology Workshop 2017, Токио, Япония, 25-26 декабря, 2017; 3rd Tokyo Vector Encounter Symposium, Токио, Япония, 9-10 марта, 2017; BGRS: Биоинформатика Регуляции и Структуры Генома, Новосибирск, Россия, 29 августа – 2 сентября, 2016; New Frontiers in Anhydrobiosis Symposium, Порнише, Франция, 23-27 марта, 2014.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в определении стратегии исследований, планировании и проведении экспериментальной работы, систематизации, анализе и интерпретации получаемых данных, обобщении и публикации результатов работы. Все основные экспериментальные результаты, описанные в настоящей работе, получены автором лично, под его руководством или при непосредственном его участии. Работа по теме диссертации была поддержана грантами РНФ (19-14-00260, 20-44-07002, 17-44-07002) и РФФИ (12-08-33157, 14-04-01657, 17-00-00243), а также грантами Японского Общества Содействия Науке JSPS (8H02217, 16K15073, 15H05622) в которых автор являлся руководителем или ключевым исполнителем. Работа по теме диссертации проводилась в сотрудничестве со Сколковским институтом науки и технологии, Институтом Проблем Передачи Информации РАН, Институтом RIKEN (Япония), университетом Juntendo (Япония), Институтом Медико-Биологических Проблем РАН, Японскими Космическим Агентством (JAXA), Госкорпорацией Роскосмос, Зоологическим Институтом РАН, Институтом Цитологии и Генетики СО РАН и Национальным Институтом Агробиологических Наук (NARO, Национальная Ассоциация Исследований в Области Сельского Хозяйства и Продовольствия, Япония).

Публикации.

Материалы диссертации нашли отражение в 41 научных публикациях, включая 40 статей и 1 тезис, индексируемые в базах данных Scopus и Web of Science (Q1 и Q2).

Объем и структура диссертации.

Материал диссертационной работы изложен на 241 страницах машинописного текста. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, выводов, списка цитированной литературы, списка сокращений. Работа содержит 53 рисунка и 6 таблиц. Список литературы включает 215 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Ангидробиоз как биологический феномен

Некоторые живые организмы обладают уникальной способностью входить в аметаболическое состояние, при которой активность жизненных процессов становится практически неотличимой от нуля. Такое состояние известно как криптоиз и рассматривается как один из универсальных механизмов выживания в экстремальных условиях окружающей среды (Møbjerg et al., 2011; Wang et al., 2014; Cannone et al., 2017). В отличие от гипометаболических состояний, таких как спячка животных или диапаузы насекомых, криптоиз полностью подавляет обмен веществ, позволяя организмам сохранять жизнеспособность в условиях, несовместимых с активной формой существования (Møbjerg et al., 2011; Guidetti et al., 2011).

Среди различных форм криптоиза, ангидробиоз занимает особое место. Он представляет собой адаптацию к самому распространенному и одновременно наиболее разрушительному фактору окружающей среды — обезвоживанию (Koshland et al., 2019; Hibshman et al., 2020; Oliver et al., 2020). Вода является основным компонентом живых систем и универсальным «растворителем жизни»: у большинства клеток 60–80 % массы составляет именно вода, а оставшаяся доля приходится на сухое вещество — белки, нуклеиновые кислоты, липиды и углеводы (Neurohr et al., 2020; Model et al., 2019). При сильном обезвоживании большинство организмов погибает. Однако некоторые представители живого мира — преимущественно беспозвоночные и микроорганизмы — способны переносить полное обезвоживание и возвращаться к активной жизни после регидратации. Это явление и получило название ангидробиоза (Crowe et al., 1998; Kieliszek et al., 2025).

Ангидробиоз — это обратимое физиологическое состояние, возникающее при глубоком обезвоживании и характеризующееся резким подавлением обменных процессов до уровней, близких к аметаболическим, с последующим восстановлением физиологических функций после регидратации. В современной научной терминологии ангидробиоз рассматривается как частный случай криптоизза, наряду с крио-, осмо- и аноксибиозом. Такой подход позволяет отделить причинный фактор (потерю воды) от конкретных молекулярных механизмов защиты (Crowe et al., 1998; Kieliszek et al., 2025).

1.2. История изучения феномена ангидробиоза

Первые задокументированные наблюдения феномена «жизни без воды» относятся к работам А. ван Левенгука (1702), описавшего «оживление» коловраток после их регидратации, и экспериментам Л. Спалланцани (также XVIII век) на микрометазоях (Keilin et al., 1959). Оба исследователя отмечали поразительную способность «высущенных» форм организмов возвращаться в активное живое состояние.

В середине XX века В.А. Килин ввёл термин «криптоизза», обозначающий «скрытую жизнь», при которой метаболические процессы становятся практически нерегистрируемыми, но полностью обратимыми при восстановлении исходных условий (Keilin et al., 1959). Ангидробиоз был выделен как наиболее распространённая форма криптоизза.

Ключевой переход от описательных наблюдений к изучению молекулярных и биофизических механизмов произошёл в 1960–1990-е годы, прежде всего в работах научной школы Дж. Кроу. В этих исследованиях были сформулированы две взаимодополняющие биофизические гипотезы устойчивости к высыханию: гипотеза замещения воды (предполагает водородное взаимодействие сахаров с полярными

группами белков и мембран) и гипотеза витрификации (предполагает переход клеточного содержимого в стеклообразное состояние, что снижает молекулярную подвижность и замедляет повреждающие реакции) (Crowe et al., 1998). Эти концепции легли в основу современных представлений о механизмах ангидробиоза.

В 1970–1990-е годы сформировалась сахарно-витрификационная парадигма ангидробиоза. Работы научной школы Дж. Х. Кроу и соавторов показали, что у широкого круга ангидробионтов в условиях обезвоживания накапливаются дисахариды — прежде всего трегалоза и сахароза. Эти соединения стабилизируют мембранные белки в сухом состоянии за счёт водородных взаимодействий и формирования стеклообразной матрицы, что сопровождается повышением температуры стеклования и кинетической стабилизацией биомолекул. Эти положения были обобщены в обзорах 1992 и 1998 годов и подтверждены рядом модельных и биофизических экспериментов, включая ставшую ключевой публикацию в *Science* (1984), в которой была показана роль трегалозы в сохранении целостности клеточных мембран при сушке (Crowe et al., 1984; Crowe et al., 1992; Crowe et al., 1998).

На рубеже 2000-х годов начинает активно развиваться концепция белковых факторов защиты. В обзорных работах Wise (2004) и Tunnacliffe & Wise (2007) подчёркивается значимость гидрофильных, неупорядоченных LEA-белков (Late Embryogenesis Abundant), изначально описанных у семян растений. Эти белки выполняют функции «молекулярных щитов», стабилизаторов мембран и белков, а также пространственных наполнителей, препятствующих агрегации при низком содержании воды (Wise et al., 2004; Tunnacliffe et al., 2007). Позднее их защитная функция была подтверждена и на животных моделях, включая раков родов *Artemia* (Goyal et al., 2005).

Наконец, современные исследования на моделях беспозвоночных, таких как *Artemia franciscana*, значительно расширили классическую сахароцентричную парадигму. Помимо трегалозы и сахарозы, в ряде линий важную роль играют полиолы, прежде всего глицерол, а также белки семейств аквапоринов и акваглицеропоринов (Finn et al., 2015; Rey-Alfonso et al., 2025). Показано, что у *A. franciscana* скоординированная активность эволюционно дивергентных глицерол-транспортёров (*EglpL*) и канонических *Glp*-каналов обеспечивает накопление глицерола в диапаузных цистах (Rey-Alfonso et al., 2025). Кинетика работы этих каналов определяет степень повреждения клеток при переходах между физиологическими состояниями и влияет на состав пула защитных соединений. Функциональные вмешательства, такие как подавление экспрессии соответствующих генов с помощью RNA-интерференции, подтверждают роль этих механизмов в реализации анgidробиоза (Rey-Alfonso et al., 2025).

Современное понимание анgidробиоза формируется как комплексная, мультифакторная система, включающая биофизические, молекулярные и физиологические механизмы. Помимо накопления сахаров и запуска процессов витрификации, важнейшими компонентами устойчивости к высыханию определены специализированные белки — LEA, IDP и биомолекулярные конденсаты (это «капли» или «гели» из белков (часто вместе с РНК), которые собираются внутри клетки), а также регуляторные механизмы транспорта воды и осмолитов, обеспечивающие гомеостаз в экстремальных условиях.

Анgidробиоз, как уникальное физиологическое состояние, является модельной системой для междисциплинарных исследований в биофизике, клеточной биологии, генетике и прикладной биотехнологии. Изучение данного феномена открывает возможности для разработки новых подходов к стабильной фиксации биоматериалов, консервации клеток, а также

моделирования механизмов устойчивости к экстремальным условиям, включая внеземную среду обитания.

1.3. Распространение ангидробиоза в живом мире

Ангидробиоз — это феномен, возникший конвергентно у представителей различных эволюционных линий, от микроорганизмов до многоклеточных животных и растений. Это говорит о высокой адаптивной способности к обитанию в условиях экстремального обезвоживания (Clegg et al., 2001; Rebecchi et al., 2007; Marks et al., 2025). У каждого отдельного таксона реализуются различные комбинации защитных механизмов, включающие накопление сахаров с формированием стеклообразного состояния, экспрессию LEA- и IDP-белков, образование биомолекулярных конденсатов, активацию антиоксидантных систем и молекулярных путей репарации повреждений (Goyal et al., 2005; Hand et al., 2011; Hibshman et al., 2020; Marks et al., 2025).

По механизму запуска можно выделить два основных типа ангидробиоза:

- индуцируемый ангидробиоз, который требует предварительной определённой физиологической подготовки (например, медленное высушивание или действие регуляторных факторов) (Watanabe et al., 2006; Rebecchi et al., 2007; Tyson et al., 2012; Dupont et al., 2014)
- конститутивный ангидробиоз, встроенный в онтогенез и не требует внешней активации — организм изначально обладает набором защитных систем, действующих автоматически при высыхании (Rebecchi et al., 2007; Tyson et al., 2012; Hibshman et al., 2020).

Такое разнообразие механизмов делает ангидробиоз важным объектом сравнительной физиологии, молекулярной биологии и эволюционной экологии. Наиболее подробно изучены данные процессы

среди представителей беспозвоночных, таких как коловратки (*Rotifera*), ракчи рода *Artemia*, круглые черви (*Nematoda*) и тихоходки (*Tardigrada*), каждый из которых демонстрирует уникальные и частично перекрывающиеся механизмы адаптации (Watanabe et al., 2006; Ricci et al., 2005; Rebecchi et al., 2007; Hibshman et al., 2020).

1.3.1 Коловратки (*Rotifera*)

Коловратки, особенно бделлоидные формы (*Bdelloidea*), являются классическими животными моделями ангидробиоза. Уже в 1702 году А. ван Левенгук описал «оживление» высушенных бделлоид после их регидратации — этот эпизод считается отправной точкой эмпирического изучения «жизни без воды» у многоклеточных животных (Leeuwenhoek et al., 1702). Исторические и экспериментальные исследования XX–XXI вв. показали, что успешность “входа” и “выхода” из состояния ангидробиоза у бделлоид сильно зависит от условий “сушки” и регидратации: скорости потери воды, уровня влажности, температуры, длительности пребывания в сухом состоянии и, особенно, режима восстановления. На морфологическом уровне наблюдается формирование «туна» — компактной формы тела с плотной упаковкой внутренних структур. При этом процент выживаемости после “сушки” увеличивается при ступенчатом, контролируемом дегидратационном подходе, обеспечивающем правильную организацию морфологии туна (Ricci et al., 2003; Ricci et al., 2005; Marotta et al., 2010).

Ключевая особенность бделлоидных коловраток — отсутствие трегалозы, традиционно рассматриваемой как универсальный углеводный протектор при ангидробиозе у животных. В классических экспериментах на *Philodina roseola* и *Adineta vaga* было показано отсутствие трегалозы или других дисахаридов в высушенных формах этих коловраток,

соответствующие гены (трегалозсинтазы) также отсутствовали в их геномах (Lapinski et al., 2003; Pouchkina-Stantcheva et al., 2007). Это опровергло представление о необходимости трегалозы для реализации процессов анgidробиоза у животных. В то же время у представителей другого подкласса, моногононтных коловраток, трегалоза выявлена в покоящихся яйцах, что подчеркивает существование дивергентных эволюционных линий даже внутри одного типа (Hespeels et al., 2015).

Молекулярный ответ бделлоид на обезвоживание включает экспрессию гидрофильных и неупорядоченных белков, а также генов необычного происхождения. Так, транскриптомный анализ *Adineta ricciae* выявил индукцию ранее неописанных гидрофильных белков, выполняющих функции стабилизации клеточных структур, аналогичные LEA-белкам растений (Boschetti et al., 2011). Более того, масштабное исследование показало, что гены горизонтального происхождения вносят существенный вклад в метаболизм и десикационный ответ (Boschetti et al., 2012; Eyres et al., 2015). В геноме *A. vaga* также были обнаружены активируемые при высыхании гены трегалоз-6-fosfat-синтазы (*TPS*) и трегалазы, полученные, по-видимому, по линии горизонтального переноса (Hespeels et al., 2015).

В контексте стабильности генома установлено, что анgidробиоз сопровождается возникновением двухцепочечных разрывов ДНК, особенно на этапах перехода между физиологическим и “сухим” состояниями. При этом бделлоиды демонстрируют высокую эффективность reparации этих повреждений. Масштаб и точность восстановления коррелируют с уровнем толерантности как к высыханию, так и к радиации (Hespeels et al., 2014; Hespeels et al., 2023). Это рассматривается как возможный механизм, объясняющий нетипичные особенности эволюции геномов бделлоид, включая свидетельства горизонтального переноса и необычную архитектуру хромосом (Nowell et al., 2018; Eyres et al., 2015).

С физиолого-экологической точки зрения, ангидробиоз у бделлоидов не просто форма защиты — это важная часть их жизненного цикла. Подтверждена так называемая модель «спящей красавицы»: время, проведённое в обезвоженном состоянии, не учитывается в физиологическом возрасте особи. Более того, жизнеспособность и фертильность после выхода из ангидробиоза, как правило, не снижаются, а иногда даже повышаются (Ricci et al., 2005). Дополнительным преимуществом дегидратированного состояния является возможность избегать патогены. Как было показано — полное высыхание позволяет избавиться от грибкового паразита, являющегося смертельным для бделлоидов, и расселяться с помощью ветра, что повышает долгосрочную устойчивость к инфекциям. (Wilson et al., 2010).

В совокупности бделлоидные коловратки представляют собой контрапункт к сахарацентричной парадигме ангидробиоза:

1. Их выживаемость строго зависит от физико-химических условий сушки и регидратации, определяющих морфологию туна (Ricci et al., 2003; Marotta et al., 2010);
2. Отсутствие классического сахара-протектора компенсируется белковыми и генетическими адаптациями: экспрессией IDP-белков и участием генов горизонтального происхождения (Lapinski et al., 2003; Boschetti et al., 2011);
3. Повреждения ДНК, возникающие в сухом состоянии, эффективно репарируются при регидратации, что связано с их высокой устойчивостью к радиации и уникальными особенностями эволюции генома (Hespeels et al., 2014; Nowell et al., 2018).

Таким образом, *Bdelloidea* являются эталонной моделью многоуровневого процесса ангидробиоза, в которой взаимодействуют физические, белковые и геномные компоненты, демонстрируя сложные, но скординированные пути адаптации к полному обезвоживанию.

1.3.2. Тихоходки (Tardigrada)

Тихоходки стали эталонной моделью животного ангидробиоза благодаря своей уникальной способности к выживанию при почти полном обезвоживании. В ответ на высыхание они также переходят в тунообразное состояние, при которой жизненные функции могут сохраняться годами и полностью восстанавливаться после регидратации (Wright et al., 1989; Guidetti et al., 2011). Исторически феномен тунообразования был зафиксирован ещё в первых описаниях данной группы (Doyère et al., 1842). Современный этап изучения механизмов ангидробиоза начался с геномных исследований *Hypsibius exemplaris* и *Ramazzottius varieornatus*, позволивших перейти от описательных наблюдений к молекулярной интерпретации (Arakawa et al., 2022).

При переходе к состоянию туна, индуцированного дегидратацией, тихоходки демонстрируют резкое снижение уровня метаболизма, устойчивость к экстремальным температурам и способность к восстановлению после длительного обезвоживания. Длительность выживания и успешность регидратации зависят от вида, условий “сушки” и физиологического состояния самого организма. Некоторые виды сохраняют жизнеспособность в сухом состоянии на протяжении месяцев и даже лет (Roszkowska et al., 2023). Одним из ключевых факторов выживания считается витрификация, переход внутриклеточной среды в стеклообразное состояние, ограничивающее молекулярную подвижность и замедляющее процессы окислительного стресса, температура стеклования служит критерием термостабильности в сухом состоянии (Hengherr et al., 2009).

В отличие от классических моделей ангидробиоза (дрожжи, артемии, нематоды), большинство тихоходок не накапливают значимых количеств трегалозы, её уровень, если и детектируется, составляет доли процента от

сухой массы (Hengherr et al., 2007). Это привело к смещению фокуса в сторону интринзически неупорядоченных белков (IDP), прежде всего семейств CAHS, SAHS и MAHS, экспрессирующихся в ответ на дегидратацию (Boothby et al., 2017). CAHS-белки формируют аморфные гели и “стекла”, стабилизирующие клеточные структуры и предотвращающие их механическое повреждение. Впоследствии было показано, что CAHS-белки могут переходить в обратимые филаментозные структуры, усиливая жёсткость цитозоля и предотвращая деформации при высыхании (Tanaka et al., 2022). Было отмечено, что при добавлении небольших количеств трегалозы (в биологически релевантных соотношениях) сильно усиливается защитное действие CAHS, как *in vitro*, так и *in vivo*, что указывает на синергизм между этими двумя типами протекторов (Nguyen et al., 2022). Дополнительную защиту обеспечивают секрецируемые SAHS-белки, сохраняющие структурную целостность после дегидратации. Новые данные показывают, что данный протектор способен стабилизировать чужеродные белки и внеклеточные структуры, указывая на роль в защите внеклеточного матрикса и тканей в условиях ангиобиоза (Lim et al., 2024).

Новые исследования указывают и на потенциал внеклеточных белков (SAHS) для стабилизации тканей и биоматериалов при высушивании, открывая перспективы в биомедицине и биотехнологии (Lim et al., 2024).

Несмотря на мощные защитные механизмы, молекулярные повреждения при ангиобиозе всё же происходят. Особенно выражен оксидативный стресс в фазах дегидратации и регидратации, сопровождающийся накоплением поврежденных макромолекул и активацией антиоксидантных систем (SOD, каталаза, глутатион-редуктаза и др.) (Giovannini et al., 2022). Выявлены молекулярные и морфологические маркёры повреждения ДНК (включая двухцепочечные разрывы), которые reparируются после восстановления водного баланса (Neumann et al., 2009).

Ключевым защитным элементом служит белок Dsup (*Damage suppressor*), обнаруженный у *R. varieornatus*. Он связывается с хроматином и снижает степень повреждений ДНК при радиационном воздействии и окислительном стрессе. Исследования показали, что он обладает гибкой структурой, позволяющей ему адаптироваться к форме ДНК, и создает вокруг неё некое "электрическое экранирование", защищая от повреждений (Chavez et al., 2019). Экспрессия Dsup в клетках человека повышает их устойчивость к радиации, что делает его потенциальным биоинженерным инструментом для защиты ядерного аппарата клетки (Hashimoto et al., 2016).

Таким образом, тихоходки представляют собой уникальную модель животного ангидробиоза, сочетающую нестандартные молекулярные стратегии защиты, от интринзически неупорядоченных белков до специализированного хроматин-связывающего белка Dsup. Их устойчивость к экстремальному обезвоживанию обусловлена не одним универсальным механизмом, а комплексной системой взаимодополняющих протекторов, что открывает перспективы для биомедицинских и биотехнологических приложений.

1.3.3. Нематоды и иные представители meiofauna

Нематоды представляют собой один из наиболее разнообразных и широко распространённых типов среди организмов, способных к ангидробиозу. Благодаря своей компактности, экологической пластичности и эволюционной древности они формируют важную часть meiofauna — организмов, обитающих в порах донных субстратов. Исторически нематоды были среди первых многоклеточных животных, у которых экспериментально зафиксировали способность выживать после

длительного обезвоживания, что сделало их одной из модельных групп в изучении криптофобиоза (Keilin et al., 1959).

Уже в 1990-х годах было показано, что свободноживущие панагролаймиды способны сохранять жизнеспособность после многолетнего хранения в высушенном состоянии — вплоть до 8,7 лет (Aroian et al., 1993). Это открыло путь к системным исследованиям и идентификации ключевых защитных механизмов. На рубеже 2000-х и 2010-х годов две модели стали особенно значимыми: *Aphelenchus avenae* и *Caenorhabditis elegans*. У *A. avenae* вхождение в ангиробиоз требует постепенного снижения относительной влажности (предобработка), сопровождаемого накоплением трегалозы и индукцией LEA-белков (Browne et al., 2004). У *C. elegans* десикационная толерантность реализуется на стадии дауэр-личинки, где показано, что потеря до 98% воды может быть пережита только при наличии трегалозы. Её дефицит делает даже мягкое обезвоживание летальным (Erkut et al., 2011). Показано также, что метаболическое переключение на глюконеогенез и глиоксилатный цикл служит источником субстратов для биосинтеза трегалозы (Erkut et al., 2016).

Физиологический успех ангиробиоза у нематод критически зависит от условий входа и выхода из сухого состояния. Для *A. avenae* поэтапное снижение влажности до ~85% является обязательным условием формирования жизнеспособного туна (Browne et al., 2004). Исследования у других видов показывают роль изменений проницаемости покровов и значимость поверхностных липидов как барьера, регулирующего скорость потери воды (Wharton et al., 2008). У антарктического *Panagrolaimus davi* описан пограничный режим между крио- и ангиробиозом — криопротективная дегидратация при высоких температурах нуклеации, позволяющая избежать формирования внутриклеточного льда (Wharton et al., 2003).

Сахарная стратегия наиболее выражена у *C. elegans* и *A. avenae*. В обоих случаях трегалоза выполняет функции стабилизатора мембран, витрификации и снижения накопления повреждений при сушке. У дауэров *C. elegans* это сопряжено с перепрограммированием метаболизма (Erkut et al., 2012).

Панагролаймиды, напротив, демонстрируют более выраженную белково-центричную модель. У *P. superbus* показано расширение семейства LEA, экспрессия IDP-белков, активация антиоксидантных каскадов (DJ-1, пероксидазы, малые HSP) и участие множества генов, жизненно необходимых для переноса высыхания (Tyson et al., 2012; Evangelista et al., 2017). Биохимические данные указывают на способность LEA-белков предотвращать агрегацию макромолекул и поддерживать функциональность белковых комплексов в условиях обезвоживания (Goyal et al., 2005; Chakrabortee et al., 2007). Наконец, антиоксидантные и репарационные системы обеспечивают устранение накопленных в процессе высыхания и регидратации повреждений, включая ROS-индуцированные нарушения. Эти системы фазоспецифично активируются у разных групп nematoda и meiofauna в целом (Giovannini et al., 2022).

Таким образом, нематоды демонстрируют широкий спектр механизмов ангидробиоза: от трегалозо- и LEA-зависимых программ до комплексных белково-конденсатных и антиоксидантных реакций. Качество ангидробиоза определяется “протоколом” входа в сухое состояние, пластичностью генома и наличием синергетических молекулярных блоков, что делает Nematoda одним из модельных животных для изучения процессов криптообиоза.

1.3.4. Ракообразные (*Artemia*)

Цисты *Artemia*, особенно *A. franciscana*, являются одной из наиболее изученных моделей животного ангидробиоза и представляют собой уникальный пример эмбрионального развития в обезвоженном состоянии (Clegg et al., 2005; Hibshman et al., 2020). Эти структуры формируются в процессе диапаузы, регулируемой стадии покоя, сопровождаемой глубоким обезвоживанием и прекращением обменных процессов, что позволяет эмбрионам сохраняться в течение длительного периода времени в условиях экстремального дефицита воды (Clegg et al., 1996; Lavens et al., 1987; Clegg et al., 2001). Современные исследования демонстрируют, что ангидробиоз цист *Artemia* представляет собой не просто реакцию на стресс, а является неотъемлемой частью их нормальной онтогенетической программы развития (MacRae et al., 2010; Ziv et al., 2017; Hibshman et al., 2020). Молекулярная архитектура ангидробиоза у *Artemia* охватывает широкий спектр защитных механизмов, действующих как на физико-химическом, так и на транскрипционно-эпигенетическом уровнях (Clegg et al., 2005; MacRae et al., 2010; Hand et al., 2018).

Цисты *Artemia* накапливают высокие концентрации трегалозы — нередуцирующего дисахарида, который способен замещать воду в гидратных оболочках макромолекул и участвовать в формировании стабилизирующей витрифицированной матрицы, предотвращающей денатурацию белков и фазовые переходы мембран в условиях почти полного обезвоживания (MacRae et al., 2016). Недавние исследования расширили «сахарную» парадигму, выявив ключевую роль глицерола. Показано, что в цистах *A. franciscana* координированно функционируют канонические акваглицеропорины и кооптированные Eglp-подобные глицерол-каналы, обеспечивая накопление глицерола, критически важного именно для ангидробиоза (а не только для криобиоза) (Rey-Alfonso et al.,

2025). С физико-химической точки зрения добавление глицерола повышает температуру стеклования трегалозных матриц, что согласуется с ростом устойчивости цист в обезвоженном состоянии (Rey-Alfonso et al., 2025).

Защитная система белков у *Artemia* отличается многокомпонентностью. Малые белки теплового шока (sHSP), такие как p26, ArHsp21 и ArHsp22, координированно экспрессируются в эмбрионах, вступающих в диапаузу. В частности, p26 не только предотвращает её спонтанное завершение, но и существенно повышает общую выживаемость и стрессоустойчивость (King et al., 2012; King et al., 2013). Ключевую роль играет артемин — гомолог ферритина, обладающий выраженной шаперонной активностью. Он в высоких концентрациях накапливается в цистах, обеспечивая защиту протеома от инактивации в условиях обезвоживания и окислительного стресса (Chen et al., 2007; Hu et al., 2010). Важность неструктурированных гидрофильных LEA-белков для выживания была напрямую продемонстрирована *in vivo*: нокдаун генов LEA-семейства у *A. franciscana* достоверно снижает жизнеспособность после высушивания и замораживания (Toxopeus et al., 2014) В совокупности эти данные подтверждают, что белковые факторы функционируют как молекулярные щиты, предотвращающие агрегацию и стабилизирующие мембранны и органеллы, тем самым эффективно дополняя механизм витрификации, обеспечиваемый сахарами.

Ключевой вклад в долговременную жизнеспособность в состоянии ангидробиоза вносит эффективный контроль над генерацией реактивных форм кислорода (ROS) и устойчивость митохондрий к кальций-индукцированным повреждениям. У *Artemia franciscana* митохондрии не демонстрируют классического Ca^{2+} -индукционного открытия поры митохондриальной проницаемости (mPTP), сохраняют высокую ёмкость поглощения кальция и резистентны к эффектам циклоспорина А и бонкреккатной кислоты — это уникальная адаптация, ограничивающая

митохондриально-опосредованный апоптоз в условиях стресса (Menze et al., 2004; Konrad et al., 2012). Параллельно при диапаузе активируются системные перестройки энергетического метаболизма и редокс-сигналинга (MacRae et al., 2010) Эти данные согласуются с концепцией, согласно которой долговременная толерантность к обезвоживанию требует не только пассивной стабилизации макромолекул, но и активного перевода митохондрий в защищенный режим функционирования, характеризующийся контролируемой генерацией ROS и ингибированием mPTP.

Диапауза цист сопровождается масштабной перестройкой транскриптома и реорганизацией ключевых регуляторных сетей. Центральным элементом этого процесса является транскрипционный фактор *HSF1*, выступающий в роли мастер-регулятора. Его нокдаун ведёт к снижению экспрессии стресс-ассоциированных белков p26, ArHsp21, ArHsp22 и артемина (Tan et al., 2018). Уменьшение уровня этих белков резко снижает устойчивость цист к обезвоживанию и другим стрессовым воздействиям, что указывает на ключевую роль HSF1-зависимого каскада в формировании комплекса белковых защитных факторов (Tan et al., 2018). На уровне хроматина показана фазоспецифическая динамика модификаций гистонов: ацетилирование H3K56 (H3K56ac) повышенено на стадии формирования диапаузы и снижается после её завершения, что участвует в остановке клеточного цикла на точке G1/S и его последующем рестарте (Zhou et al., 2013). Параллельно метилтрансфераза SETD4, катализирующая trimетилирование H4K20 (H4K20me3), необходима для поддержания состояния клеточного покоя в диапаузирующих эмбрионах, её нокаут нарушает процесс формирования цист и выход из состояния покоя (Dai et al., 2017). Совокупность этих результатов указывает, что анgidробиоз у *Artemia* представляет собой многоуровневую программу, организованную

по принципу «слой за слоем»: от быстрых транскрипционных сдвигов до стабильных эпигенетических модификаций.

Таким образом, *Artemia* иллюстрирует важную концептуальную идею: ангидробиоз может быть не только «экстренной» физиологической реакцией на отсутствие воды, но и частью онтогенетически запрограммированной жизненной программы, сопряжённой с фазами развития. Этот пример имеет особое значение для сравнительной биологии и физиологии животных, у которых диапауза также сопряжена с элементами десиккационной толерантности. Модель *Artemia* даёт ключ к пониманию того, как биохимическая, молекулярная и эпигенетическая архитектура ангидробиоза может быть встроена в нормальную программу развития животных.

1.3.5. Микроэукариоты (дрожжи)

Дрожжи, и в особенности *Saccharomyces cerevisiae*, являются одной из наиболее глубоко изученных модельных систем для исследования механизмов толерантности к полному обезвоживанию среди эукариотических микроорганизмов (Calahan et al., 2011). Феноменологической основой для этого служит резкая зависимость выживаемости от физиологического состояния культуры: в логарифмической фазе роста после высушивания выживает менее 10^{-6} клеток, тогда как в стационарной фазе жизнеспособность может достигать 20–40% (Calahan et al., 2011). Более того, показано, что среди экспоненциально растущих клеток выживают преимущественно те, которые находятся в фазе G1 и обладают конденсированным хроматином, морфологически сходным с состоянием покоя (G0) (Zhang et al., 2021). Эти наблюдения позволяют рассматривать устойчивость к обезвоживанию не как статичную видовую характеристику, а как программируемый и

высокопластичный фенотип, зависящий от предыстории роста клеток, их физиологического статуса и условий предварительной адаптации (preconditioning). На молекулярном уровне такие сдвиги координируются сигнальными каскадами TOR/PKA→Sch9 и системой общей стресс-резистентности ESR (Welch et al., 2012).

Достаточное содержание в клетках трегалозы как защитного фактора подтверждают два ключевых исследования. Так, искусственное накопление трегалозы в клетках логарифмической фазы роста переводит их из состояния высокой чувствительности в состояние, толерантное к обезвоживанию, повышая выживаемость на четыре порядка величины (Tapia et al., 2015). Также, показано, что трегалоза действует как устойчивый химический шперон, превосходящий по спектру защитных эффектов многие белковые аналоги (Tapia et al., 2014). Эти данные легли в основу витрификационной модели, согласно которой высокие концентрации трегалозы обеспечивают переход цитозоля в стеклообразное состояние, стабилизируя белки и липидные мембранны, и тем самым существенно снижая эффект деструктивных процессов. Критическим моментом является достижение пороговой концентрации трегалозы, которая определяет резкий, нелинейный переход от полной. У дрожжей описан особый класс коротких гидрофильных и неструктурированных белков — так называемых hydrophilins, функционально аналогичных LEA/IDP-белкам растений и животных. Один из наиболее изученных представителей — белок Hsp12, локализующийся на плазматической мембране, где он защищает липидный бислой от повреждений, вызванных обезвоживанием. (Sales et al., 2000). Недавние исследования подтвердили функциональную синергию Hsp12 и трегалозы: совместное присутствие этих факторов полностью предотвращает летальные повреждения, которые могут быть фатальными при дефиците одного из компонентов (Kim et al., 2018). Кроме того, Hsp12 способен ремоделировать мембранны и, вероятно,

участвует в формировании вязкоэластичных защитных матриц, стабилизирующих структуру клетки в обезвоженном состоянии (Kim et al., 2018).

Фаза G1, для которой характерна конденсация хроматина, является критически важной для выживания в условиях дегидратации, что указывает на глубокую связь между толерантностью к обезвоживанию и масштабной реорганизацией хроматина (Zhang et al., 2021). На молекулярном уровне индукция экспрессии таких генов, как HSP12 и других гидрофилинов, ассоциирована с активностью крупных хроматин-модифицирующих комплексов, в частности, SAGA (с каталитической субъединицей Gcn5) и других транскрипционных коактиваторов. Особый интерес представляет модификация гистона H3K56ac, которая рассматривается в качестве потенциального эпигенетического маркера «лабильного» или «ремоделированного» хроматина, сохраняющего способность к эффективному восстановлению после экстремального стресса (Duan et al., 2025). Совокупность этих данных подтверждает концепцию, согласно которой хроматин выступает не пассивным субстратом, а активным регуляторным компонентом, координирующим процессы входа в состояние анgidробиоза и выхода из него.

Обезвоживание и, особенно, регидратация сопровождаются всплесками образования активных форм кислорода, что требует запуска антиоксидантных каскадов, включая системы тиоредоксина, глутатион-редуктазы и ключевого транскрипционного регулятора Yap1 (Indo et al., 2015). Дефицит компонентов этих путей (TRX, GR, Yap1) резко повышает чувствительность клеток к окислительным повреждениям (Morano et al., 2011; Farrugia et al., 2012; Takallou et al., 2024). Более того, тепловой шок, активирующий эти каскады, в значительной степени повышает выживаемость дрожжей при последующем высушивании, в то время как

осмотическая или окислительная «претренировка» менее эффективна (Welch et al., 2012).

В совокупности дрожжевая модель подтверждает универсальность архитектуры ангидробиоза, аналогичной животным моделям (тихоходки, нематоды, *Artemia*).

1.3.6. Насекомые (включая двукрылых)

Среди насекомых спектр адаптаций к дефициту воды исключительно широк — от модификаций структуры яичной оболочки и кутикулы, снижающих транс-кутикулярные потери влаги, до сложных метаболических перестроек, повышающих устойчивость к высушиванию (Benoit et al., 2017).

Тем не менее, случаи истинного ангидробиоза среди насекомых остаются казуистически редкими. Классическим и, по существу, единственным полноценно охарактеризованным модельным объектом в этой области служат личинки африканского комара-звонца *Polypedilum vanderplanki* (Diptera: Chironomidae), способные переносить практически полную дегидратацию с последующим полным восстановлением физиологических функций после регидратации (Watanabe et al., 2002).

Исторически первые указания на экстремальную толерантность *P. vanderplanki* к обезвоживанию и температурным стрессам были сделаны Хинтоном (Hinton). Современная экспериментальная физиология не только подтвердила эти первоначальные наблюдения, но и детально охарактеризовала экологический контекст данного феномена: личинки развиваются во временных (эфемерных) водоемах на каменистых субстратах, где регулярные циклы наполнения и высыхания являются мощным селективным фактором, обусловившим формирование механизмов выживания через переход в состояние глубокого покоя. При

этом восстановление жизнедеятельности возможно даже после многолетних периодов в обезвоженном состоянии (Watanabe et al., 2002). В последнее время появляется ряд свидетельств, что толерантность к практически полному обезвоживанию может быть распространена и за пределами данной группы насекомых, но, на сегодняшний момент личинки комаров звонцов остаются единственной задокументированным истинно ангидробитической группой насекомых.

1.4. Эволюционное значение ангидробиоза и его возможное практическое применение

1.4.1. Эволюционное значение

Ангидробиоз — одна из самых ярких форм криптоциоза, которая позволила различным группам организмов адаптироваться к жизни вне стабильных водных условий. Одновременное и независимое возникновение подобного механизма у представителей различных царств — микроорганизмов, растений и животных (дрожжи, коловратки, тихоходки, нематоды, ракообразные, насекомые), указывает на конвергентную природу адаптивных процессов, основанных на универсальных физико-химических принципах: витрификация, использовании IDP-белков, регуляции редокс-гомеостаза и других (Caprioli et al., 2001; Rebecchi et al., 2020).

На уровне эволюционной адаптации ангидробиоз выполняет несколько ключевых функций:

1. Сохранение генетического разнообразия в неблагоприятных условиях.

Цисты ракообразных (*Artemia*), туны тихоходок, дауэры нематод и покоящиеся яйца коловраток формируют резервный «банк стадий покоя» в

составе популяции. Это обеспечивает её выживание и демографическую стабильность даже при длительном отсутствии воды или в условиях экстремального стресса (Caprioli et al., 2001; Rebecchi et al., 2020).

2. Освоение экстремальных местообитаний.

Организмы, способные к ангидробиозу, заселяют кратковременные и экстремальные среды обитания: пересыхающие водоёмы, засушливые почвы, солончаки, эпифитные лишайники. Эта способность расширяет экологические границы и способствует увеличению биоразнообразия в составе микро- и мезофауны (Rebecchi et al., 2020).

3. Влияние на геномную эволюцию.

Повторяющиеся циклы обезвоживания и регидратации приводят к повреждению ДНК, включая двуцепочечные разрывы (Rebecchi et al., 2009). Это стало фактором естественного отбора лучших и усиленных систем репарации (BER, NHEJ, HR) и могло способствовать появлению уникальной геномной “подписи”, как например высокая частота горизонтального переноса генов у бделлоидных коловраток (Hespeels et al., 2014).

4. Модульная природа механизмов.

Ангидробиоз не реализуется через единую универсальную программу, а представляет собой модульную систему. Разные таксоны используют отличающиеся биохимические процессы: формирование сахарного стекла (дрожжи, *Artemia*), белки IDP и LEA (тихоходки, нематоды рода *Panagrolaimus*), образование конденсатов (Elder et al., 2025), либо их сочетания. Это отражает принцип эволюционной конвергенции, при котором разные молекулярные подходы обеспечивают одну и ту же функцию — стабилизацию клеточной структуры при полном обезвоживании.

Таким образом, ангидробиоз имеет фундаментальное эволюционное значение, который открыл возможность для различных линий живых организмов приспосабливаться к безводной среде обитания.

1.4.2. Прикладное значение и трансляционный потенциал ангидробиоза

Изучение ангидробиоза вышло за пределы фундаментальной биологии. Механизмы, выработанные в ходе эволюции для выживания в условиях крайнего обезвоживания, находят применение в биомедицине, сельском хозяйстве, биотехнологии и других прикладных областях. Ключевые направления трансляции могут включать:

1. Биомедицина и хранение биоматериалов.

Тргалоза и белки LEA-типа рассматриваются как эффективные средства для сухого хранения клеток, ферментов и вакцин без необходимости глубокой заморозки (Crowe et al., 1998; Tapia et al., 2015). Введение LEA-белков или IDP в клеточные культуры млекопитающих демонстрирует повышение устойчивости к высушиванию и замораживанию, открывая путь к разработке технологий «сухой консервации».

2. Агробиотехнологии.

Изучение резурректантных растений и беспозвоночных ангидробионтов выявило перспективы трансгенной интеграции белков LEA, антиоксидантных каскадов и сахарных транспортеров в культурные растения. Это может значительно повысить их засухоустойчивость и продуктивность в условиях изменения климата (Grzyb et al., 2022; Hespeels et al., 2014).

3. Астро- и радиobiология.

Некоторые ангидробионты, в частности тихоходки и коловратки, демонстрируют повышенную устойчивость к условиям вакуума, радиации и экстремальным температурам. Эти свойства делают их ценными моделями для изучения пределов жизнеспособности и разработки биотехнологий, применимых в условиях космоса (Rebecchi et al., 2009; Chatani et al., 2016).

4. Синтетическая биология.

Идентификация ключевых белков, таких как IDP, LEA, CAHS и транспортер TRET1, открывает возможности для создания устойчивых биологических систем. Это включает разработку «сухих биореакторов», биосенсоров, стабильных при комнатной температуре, а также новых платформ для хранения и транспортировки биологических материалов (Kikawada et al., 2007; Elder et al., 2025; Grzyb et al., 2022).

На фоне существующих моделей ангидробиоза особый интерес представляет африканский комар-звонец *Polypedilum vanderplanki*, личинки которого демонстрируют полноценный ангидробиоз на уровне многоклеточного организма. В отличие от других широко используемых объектов (дрожжи, тихоходки, *Artemia*), данный феномен у *Polypedilum* реализуется в рамках целостного онтогенеза и интегрирован на уровне тканей и систем органов (Cornette et al., 2011; Yoshida et al., 2022).

1.5. Комары-звонцы рода *Polypedilum* как модель ангидробиоза

1.5.1. Жизненный цикл, ареал обитания и механизмы личиночного ангидробиоза у *Polypedilum vanderplanki*

Как уже отмечалось, среди описанных моделей ангидробиоза многоклеточных, основными являются представители экологической ниши микрометазои: тихоходки (Tardigrada), нематоды (Nematoda) и бделоидные

колоуратки (Bdelloidea) (Hibshman et al., 2020; Arakawa et al., 2022; Nowel et al., 2018). Именно эти группы регулярно упоминаются в научной литературе и фактически считаются общепринятым стандартом проявления криптобиоза. На этом фоне личинка хирономиды *Polypedilum vanderplanki* представляет собой принципиально более крупный организм для исследования феномена ангидробиоза (Hinton et al., 1960).

Жизненный цикл *P. vanderplanki*, как и у прочих хирономид, включает 4 стадии: 1) яйцо; 2) личинка; 3) куколка; 4) имаго (Kranzfelder et al., 2015). Естественный ареал обитания — это каменистая местность в северной части Нигерии с полуаридным климатом, характеризующимся сменой засушливых и дождливых сезонов. Такой климат в сочетании со скальными водоемами обуславливает периодическую смену фаз их высыхания и последующего наполнения водой. Подобные неглубокие резервуары являются основным местообитанием *P. vanderplanki*, прямо влияющими на реализацию ангидробиоза. Самки откладывают под поверхность воды желатинозную массу с агрегатами яиц, которые затем опускаются на дно. Через 2-3 дня из яиц вылупляются личинки, которые покидают кладку и проникают внутрь грунта. В почве, на дне водоема, личинки сооружают трубчатые гнезда, используя частички детрита и свою слюну. Эти футляры в виде трубок являются физическим защитным барьером от факторов внешней среды и хищников, а также способствуют успешному ангидробиозу, снижая скорость обезвоживания. Стадия куколки у *P. vanderplanki* водная и кратковременная, примерно 1-2 суток. После созревания взрослая особь поднимается со дна к поверхности воды и покидает свой экзувий (Kikawada et al., 2005; Shaikhutdinov et al., 2020) (Рисунок 1).

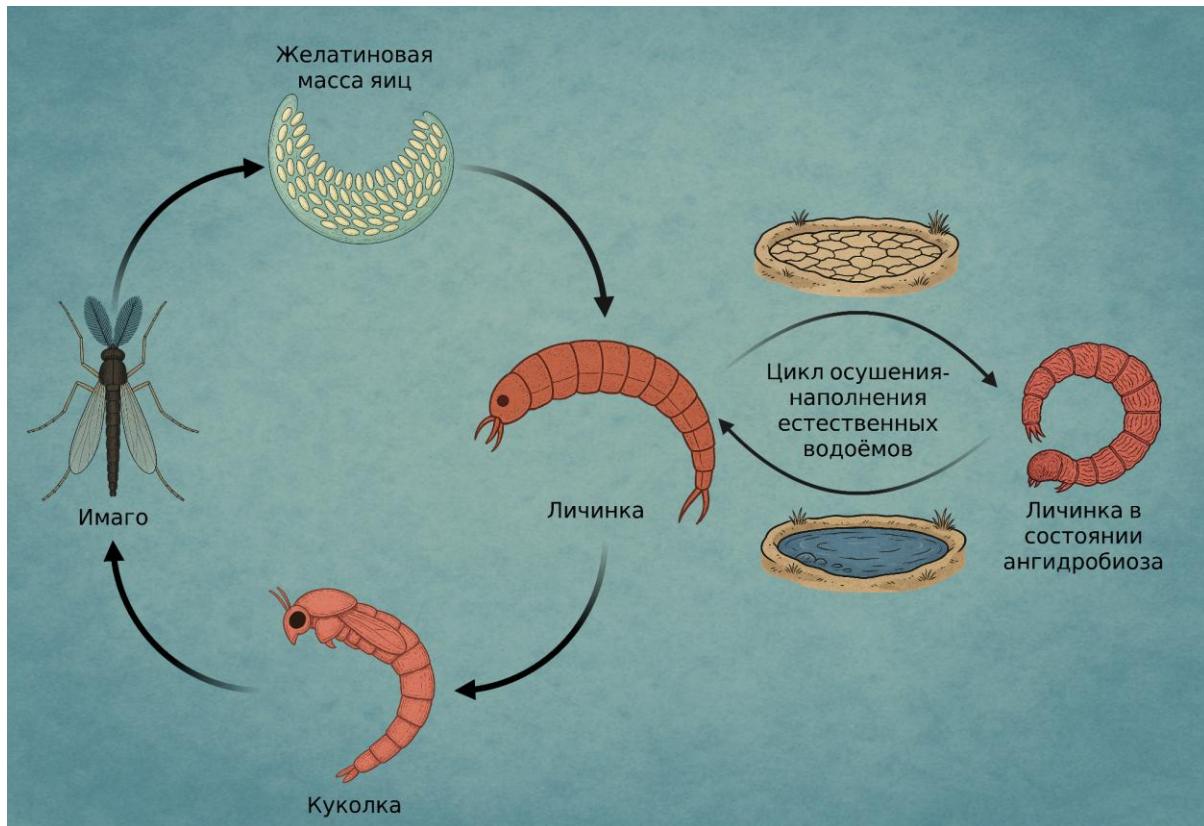


Рисунок 1 – Схема жизненного цикла и ангиобиоза *Polypedilum vanderplanki*.

В пределах описанного жизненного цикла *P. vanderplanki* ангиобиоз реализуется именно на личиночной стадии. Для прочих стадий цикла этот феномен не задокументирован. Принципиально важным является тот факт, что личинки *P. vanderplanki* демонстрируют не просто резистентность к дефициту воды, а именно способность к истинному ангиобиозом. Данное состояние характеризуется подавлением метаболизма до предела его детекции после полного удаления воды и сохранением жизнеспособности после регидратации (Watanabe et al., 2002 Sakurai, 2008 et al., Cornette et al., 2011). Эффективность процесса ангиобиоза как в отношении “входа” в это состояние, так и “выхода” к обычному физиологическому состоянию определяется кинетикой обезвоживания и характерными биохимическими изменениями. Эффективная индукция требует ступенчатой дегидратации -

последовательного снижения относительной влажности до окончательного высыхания. Такой подход обеспечивает значительно более высокую выживаемость личинок в сравнении с резкой дегидратацией (Yamada et al., 2020; Knutelski et al., 1951). В естественных условиях обитания подобное мягкое высушивание осуществляется благодаря трубчатыми гнездами (Kikawada et al., 2005). В контексте же биохимических изменений и адаптаций, значимым является механизм витрификации. Этот процесс характеризуется накоплением в клетках белков позднего эмбриогенеза (LEA - Late Embryogenesis Abundant) и невосстановливающего дисахарида трегалозы (Tanaka et al., 2015) - основного углевода гемолимфы насекомых.

LEA белки, ассоциированные с устойчивостью к абиотическому стрессу, подразделяются на 3 группы и являются одним из защитных механизмов при обезвоживании и снижении окружающей температуры (Tunnacliffe et al., 2007). Классификация на группы не строгая и основана на наличии определенных мотивов последовательностей аминокислот (Wise et al., 2004). Белки 2 группы, известные также как дегидрины, встречаются только у растений, группы 1 и 2 обнаруживаются у бактерий и беспозвоночных (Tunnacliffe et al., 2007; Wise et al., 2004). Одной из ключевых функций LEA-белков является конформационный сдвиг и формировании α -спиральной структуры индуцированное обезвоживанием. (Goyal et al., 2003). Образование подобных суперспирализованных филаментов, по-видимому, может повышать механическую прочность клеток при дегидратации, противодействуя механическим нагрузкам, приводящим к плазмолизу и деформации клеток (Wolfe et al., 1986; Goyal et al., 2003). Детальный разбор разновидностей LEA-белков в отношении тканевой специфиности, клеточной локализации и функциональных особенностей в динамике дегидратации/регистратации будет предоставлен в следующих главах.

Трегалоза синтезируется в жировом теле из гликогена, поступает в гемолимфу и метаболизируется ферментом трегалазой до глюкозы, поддерживая гомеостаз углеводов (Wyatt et al., 1957; Becker et al., 1996; Shukla et al., 2015). При индукции «сухого» состояния у личинок *P. vanderplanki* трегалоза быстро накапливается за счёт координированной работы ферментов трегалозо-б-fosфатсинтазы и трегалозо-б-фосфатфосфатазы (Mitsumasu et al., 2010). В процессе ангидробиоза, сочетание LEA-белков и трегалозы формирует водородные связи с мембранными, образуя стеклоподобный матрикс, который защищает клеточное содержимое, стабилизируя белки и липидные структуры (Tanaka et al., 2015; Franks et al., 1991; Levine et al., 1992; Crowe et al., 1998). При регидратации же уровень трегалозы снижается за счет активации трегалазы - формируется двусторонний ферментативный “переключатель”, который как индуцирует ангидробиоз, так и обеспечивает источник энергии на ранних этапах регидратации и восстановления метаболизма (Mitsumasu et al., 2010).

Таким образом, ангидробиоз у *P. vanderplanki* следует рассматривать как результат адаптивной эволюции, обеспечившей данному виду существенные преимущества в условиях пересыхающих местообитаний. Данный комплекс адаптаций, включающий поведенческо-морфологические и биохимические механизмы (трубчатые гнезда, ступенчатая дегидратация, витрификация), существенно повышает вероятность выживания в условиях постоянной циклической смены засухи и периода восстановления водной среды (Yoshida et al., 2022; Knutelski et al., 1951).

1.5.2. Морфология и толерантность к обезвоживанию у ангиробиотических видов *Polypedilum vanderplanki* и *P. pembai* в сравнении с типичным представителем рода *P. nubifer*

Однако *Polypedilum vanderplanki* не единственный представитель данного рода комаров-звонцов, обладающий достоверной способностью к ангиробиозу. Близкородственный вид *Polypedilum pembai* (долгое время рассматривавшийся как подвид *P. vanderplanki*), обитающий в Малави, также способен реализовывать феномен “сухого” состояния, аналогичного *P. vanderplanki* (Shaikhutdinov et al., 2023). Реализация ангиробиотического состояния у двух видов во многом схожа на уровне молекулярных и клеточных механизмов и включает в себя ступенчатый процесс обезвоживания, накопление трегалозы и последующую регидратацию с восстановлением метаболизма и репродуктивных функций. Морфология двух видов очень близка, но отличается такими признаками как форма головной капсулы личинки, расположение и количество щетинок на теле личинки, строение гениталий имаго (Cornette et al., 2017). Таким образом, можно предположить, что *P. pembai*, по-видимому, происходит от общего с *P. vanderplanki* предка, обладавшего сходной адаптацией к засушливым местам обитания.

В дополнение к ангиробионтным видам хирономид следует отметить *Polypedilum nubifer*, демонстрирующий классическую для насекомых чувствительность к дегидратации. Несмотря на схожесть морфологии имаго и личинки, *P. nubifer* чувствителен к наличию воды и не формирует “сухой” фазы в своем онтогенезе (Duchet et al., 2015). В итоге *P. nubifer* таксономически близок, но физиологически отличается от ангиробионтных видов рода, что делает его удобным контрольным объектом при изучении хирономид с способностью к ангиробиозу.

1.5.3. Значение *Polypedilum* как модельных объектов

В отличии от микрометазойных организмов способных к ангидробиозу (тихоходки, нематоды, коловратки) хирономиды *Polypedilum* являются существенно более крупным по размеру объектом (Mazin et al., 2018; Hinton et al., 1960). Это морфологическое отличие имеет принципиальное значение для экспериментальных задач: размеры личинок и имаго значительно упрощают микродиссекцию жирового тела, эпителиальных пластов и других тканей, что обеспечивает получение качественного биоматериала для специфических транскриптомных и метаболомных исследований. Наличие большого объёма тканей не только повышает достоверность количественного анализа, но и позволяет более точно прослеживать молекулярные сдвиги в динамике дегидратации и регидратации, которые будут рассмотрены в последующих разделах. Крупные размеры также делают *Polypedilum* перспективным объектом для применения пространственных мультиомиксных подходов, таких как масс-спектрометрическая визуализация, лазерная микродиссекция и пространственная транскриптомика (Zhang et al., 2024). Подобные технологии, в совокупности с доступностью экспериментального материала, открывают возможность локализованного анализа защитных механизмов на тканевом и субклеточном уровнях, включая визуализацию трегалозной витрификации на различных стадиях дегидратации. Дополнительным преимуществом модели *Polypedilum* является наличие в пределах рода как двух видов с выраженной устойчивостью к обезвоживанию (*P. vanderplanki* и *P. pembai*), так и одного чувствительного к дегидратации вида (*P. nubifer*). Это позволяет проводить верифицированные межвидовые сопоставления и идентифицировать молекулярные признаки, специфически ассоциированные с феноменом

ангидробиоза, а также анализировать степень конвергентности адаптаций на филогенетически близком фоне (Shaikhutdinov et al., 2022).

Уже очевидно, что понимание теоретических основ длительного сохранения жизнеспособности биологических объектов, на примере *Polypedilum*, имеет в высшей степени важное значение, как фундаментальное, так и прикладное. Технологии безводного хранения биоматериала при положительных температурах, возможно даже на основе витрификации, будут лишены негативных последствий длительной криоконсервации (Crowe et al., 1998; Karlsson et al., 1996). Практическое применение такой способности не ограничится биотехнологическими задачами, а может быть применено в разных областях - от клинической практики до космической отрасли, что еще раз убеждает в важности изучение этого уникального организма.

1.6. Гипотеза экстремальной устойчивости *Polypedilum vanderplanki* в условиях ангиодробиоза

1.6.1. Экстремальная кросс-устойчивость и гипотеза защиты ДНК

Дегидратация неизбежно сопровождается множеством клеточных стрессов, включая механическое повреждение хроматина, ионные сдвиги и нарушение осмотического гомеостаза. В совокупности эти факторы создают угрозу для структурной целостности генетического материала, что делает поддержание стабильности ДНК одной из приоритетных задач в условиях ангиодробиоза. Потеря воды также приводит к функциональной дестабилизации ферментов и компонентов электрон-транспортной цепи, сопровождаясь образованием активных форм кислорода (АФК) (Womersley et al., 1987; França et al., 2007). В совокупности это многофакторное воздействие ведет к модификации оснований и белков хроматина,

возникают одноцепочечные и двуцепочечные разрывы ДНК. (Hespeels et al., 2014 et al., Neumann et al., 2009; Hibshman et al., 2020). Особое значение имеют не только переходные этапы — «вход» и «выход» из состояния ангиробиоза, — но и длительное пребывание организма в «сухой» фазе. Повышенная влажность или температура среды могут изменять физические свойства витрифицированной матрицы, превращая её в высоковязкое, «резиноподобное» состояние, что снижает защитную способность и повышает диффузию кислорода (Sakurai et al., 2008). Это способствует утечке электронов из дыхательной цепи и генерации супероксид-радикала (O_2^-) и перекиси водорода (H_2O_2). Во взаимодействии с переходными металлами эндогенного клеточного пулла, в частности ионами Fe^{2+} , катализируются реакции Фентона/Габера–Вейса, что приводит к усилению процессов автоокисления, накоплению повреждений клеточных структур и снижению выживаемости (Grzyb et al., 2022; Rebecchi et al., 2009; Cornette et al., 2023). Таким образом успешность “выхода” из обезвоженного состояния зависит либо от механизмов, предотвращающих описанные повреждения генетического материала, либо от наличия эффективных процессов восстановления ДНК (Hespeels et al., 2014; Neumann et al., 2009; Hibshman et al., 2020).

Наличие таких репаративных систем подтверждается широким феноменом кросс-устойчивости организмов, способных к ангиробиозу, к другим экстремальным воздействиям — ионизирующему излучению, ультрафиолету и космическому вакууму. Например, тихоходки, обладающие способностью к ангиробиозу, также могут выдерживать экспозицию в открытом космосе, подвергаясь воздействию вакуума низкой околоземной орбиты и полному спектру солнечного излучения. После возвращения на Землю этот вид демонстрируют восстановление физиологической активности и сохранение репродуктивной функции (Erdmann et al., 2017; Jönsson et al., 2008). Сходная картина наблюдается и у

другого вида способного к дегидратации - белоидных коловраток, но в контексте реакции на ионизирующее излучение. Дозы облучения, фатальные для большинства животных, остаются безопасными для коловраток. При этом механизм такой устойчивости заключается не в защитных свойствах самой клетки от радиации, а в мощных репаративных системах ДНК. Даже при массивном разрушении генома ионизирующим излучением, коловратки сохраняют способность к его восстановлению (Gladyshev et al., 2008).

Сходные закономерности установлены и для *Polypedilum vanderplanki*, который в состоянии ангиробиоза демонстрирует резкое повышение радиорезистентности. Подвергнутые γ -облучению в дозе около 5 кГр личинки в «сухой» фазе сохраняют жизнеспособность через 48 часов после регидратации, а некоторые особи и после 7 кГр. Тогда как в «влажной» фазе наблюдается дозозависимая гибель с полным летальным исходом уже при 3–3,5 кГр в течение 8–24 ч. Вместе с тем онтогенетические показатели существенно чувствительнее: для γ -облучённых на личиночной стадии животных медианные ингибирующие дозы составляют порядка 460 Гр для окукливания и ~160 Гр для выхода имаго; продукция жизнеспособного потомства практически прекращается при ~200 Гр. Функциональная программа ангиробиоза при этом сохраняется даже после высоких доз радиации. Значительная часть ранее облучённых личинок (около 80%) повторно входит в «сухое» состояние после облучения при 3 кГр и способна к успешному выходу из него (Watanabe et al., 2006; Watanabe et al., 2007).

Повышенная радиорезистентность наблюдается не только в полностью высушенном состоянии, но и в переходных фазах дегидратации и регидратации. В опытах с высоко-LET излучением (${}^4\text{He}$, 50 МэВ, $\text{LET} \approx 16$ кэВ/мкм) показано, что длительность пострадиационного выживания положительно коррелирует с содержанием трегалозы, а дополнительное

преимущество «сухих» личинок указывает на вклад витрификации в физико-химическую стабилизацию макромолекул (Watanabe et al., 2006; Watanabe, 2007). Эти результаты согласуются с двухконтурной моделью радиоустойчивости *P. vanderplanki*: 1) физико-химическая стабилизация биомакромолекул и мембран в стеклоподобной матрице при минимальном содержании свободной воды (Watanabe et al., 2007; Buitink et al., 2004) и 2) индуцируемые дегидратацией/регистратацией программы стресс-ответа, включая накопление осмо-/криопротекторов (Ryabova et al., 2020).

Эти механизмы формируют основу многофакторной кросс-устойчивости, которая обеспечивает выживаемость *P. vanderplanki* в условиях экстремального радиационного, осмотического и оксидативного стресса. По-видимому, именно эффективная защита генома и способность к его восстановлению являются центральными элементами адаптивного потенциала, определяющими феноменальную устойчивость данного вида.

1.6.2. Роль трегалозы и восстановление энергетического обмена у *Polypedilum vanderplanki*

Одним из центральных биохимических факторов, обеспечивающих толерантность личинок *Polypedilum vanderplanki* к полному обезвоживанию, является трегалоза — дисахарид, состоящий из двух молекул глюкозы, соединенных α,α -1,1-гликозидной связью (Рисунок 2). В отличие от большинства насекомых, у которых содержание трегалозы ограничено физиологическими концентрациями гемолимфы, личинки африканского хирономида аккумулируют её в количествах, сопоставимых с 15–20 % сухой массы организма. Эта особенность ставит *P. vanderplanki* в один ряд с семенами растений и цистами ракообразных (*Artemia*), где роль трегалозы в ангидробиозе изучена наиболее детально (Clegg et al., 2005; MacRae et al., 2010).

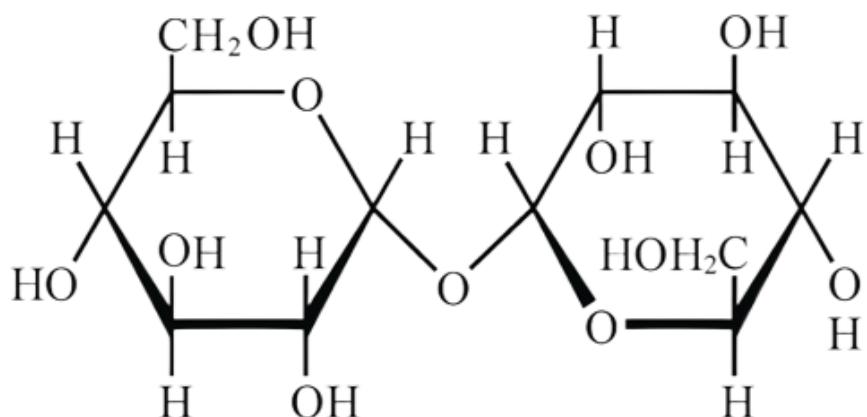


Рисунок 2. Структурная формула трегалозы

Функции трегалозы в ангиодробиозе можно условно разделить на структурно-защитные и метаболические. С одной стороны, трегалоза формирует стеклообразную матрицу при обезвоживании, стабилизируя макромолекулы и мембранные структуры посредством водозамещения. При этом сахар образует многочисленные водородные связи с полярными остатками липидов и белков, препятствуя денатурации и фазовым переходам мембран (Crowe et al., 1984; Crowe et al., 2002; Pereira et al., 2008). С другой стороны, трегалоза служит стратегическим энергетическим резервом, который мобилизуется в процессе регидратации и ранних фаз восстановления метаболической активности (Behm et al., 1997).

1.6.3. Молекулярная структура трегалозы

Трегалоза представляет собой α,α -1,1-гликозид, образованный двумя остатками D-глюкозы. Такая уникальная связь делает её невосстанавливющимся сахаром, поскольку оба аномерных центра участвуют в гликозидной связи. Это придает молекуле исключительную химическую стабильность по сравнению с другими дисахаридами, включая мальтозу или сахарозу (Elbein et al., 2003; Richards et al., 2002; Walmagh et al., 2015).

Высокая гидрофильность трегалозы обеспечивает способность формировать множественные водородные связи как с водой, так и с гидрофильными группами белков и липидов. В условиях дегидратации именно эта особенность позволяет сахару выполнять функцию заменителя воды, предотвращая разрушение макромолекулярных структур. При концентрациях, характерных для ангидробиотических организмов, трегалоза также переходит в аморфное стеклообразное состояние с высоким температурным порогом стеклования, что дополнитель но стабилизирует структуры биологической системы в сухом виде (Crowe et al., 1998; Sakurai et al., 2008; Jain et al., 2009).

Таким образом, уникальная молекулярная архитектура трегалозы обусловливает её двойственную роль: с одной стороны — физико-химическую стабилизацию биомолекул, с другой — источником быстро мобилизуемой энергии в фазе восстановления метаболизма после регидратации.

1.6.4. Роль трегалозы в запуске энергетического обмена

После регидратации личинок *P. vanderplanki* наблюдается стремительная активация гидролитических ферментов, прежде всего трегалазы, катализирующей расщепление трегалозы до двух молекул глюкозы. Последующая гликолитическая деградация глюкозы обеспечивает быстрый приток пирувата и восстановление пула АТФ в условиях, когда митохондриальная функция ещё частично ограничена вследствие структурных повреждений, накопленных в ходе обезвоживания. Таким образом, гликолиз играет роль первичного энергетического «моста» между выходом из ангидробиоза и полноценным запуском окислительного метаболизма (Mitsumasu et al., 2010; Ryabova et al., 2020).

1.6.5. Восстановление цикла лимонной кислоты

Ключевым этапом в полном возобновлении энергетического обмена является репарация митохондриальных структур и восстановление цикла трикарбоновых кислот (цикла лимонной кислоты). Поступающий из гликолиза пируват через пируватдегидрогеназный комплекс конвертируется в ацетил-КоА, который включается в ЦТК. Восстановление активности ферментов цикла, включая цитратсинтазу, изоцитратдегидрогеназу и сукцинатдегидрогеназу, обеспечивает не только образование промежуточных метаболитов, но и интенсивное восстановление пулов NADH и FADH₂. Эти восстановленные кофакторы запускают работу дыхательной цепи, что сопровождается возобновлением полноценного окислительного фосфорилирования (Ryabova et al., 2020; Belott, et al., 2024).

Особое значение в данном контексте имеет факт, что митохондрии *P. vanderplanki* демонстрируют необычайно высокую устойчивость к структурным нарушениям, индуцируемым обезвоживанием. Современные исследования свидетельствуют о способности личинок восстанавливать целостность митохондриальных мембран и активность ЦТК в течение первых часов после регидратации, что резко контрастирует с большинством обезвоженных эукариот, где подобные повреждения носят необратимый характер (Ryabova et al., 2020; Belott et al., 2024).

1.6.6. Белки теплового шока: различия стресс-ответа при тепловом шоке и обезвоживании

Белки теплового шока (heat shock proteins, HSP) представляют собой высококонсервативное семейство молекулярных шаперонов, которые поддерживают протеостаз как в базовых условиях, так и при действии

различных стрессовых факторов (Hu et al., 2022). Эти белки препятствуют агрегации частично денатурированных полипептидов, стабилизируют промежуточные конформации, участвуют в рефолдинге и динамике мультибелковых комплексов, а также взаимодействуют с системами деградации белка, включая убиквитин протеасомный путь и аутофагию (Hu et al., 2022). У насекомых HSP рассматриваются как ключевой элемент универсального стресс ответа, связанный с антиоксидантной защитой, иммунными реакциями и метаболической перестройкой при неблагоприятных внешних воздействиях (Banfi et al., 2025).

Классический ответ на тепловой шок опирается на активацию транскрипционного фактора HSF1. В отсутствие стресса HSF1 удерживается в неактивном состоянии комплексами с HSP70 и HSP90. При повышении температуры увеличивается количество поврежденных белков, которые конкурируют с HSF1 за связывание с шаперонами. Это приводит к освобождению HSF1, его тримеризации и связыванию с регуляторными областями генов HSP, что обеспечивает быстрый рост их транскрипции и последующий синтез шаперонов (Boopathy et al., 2022). В данном случае HSP действуют преимущественно реактивно, распознавая уже поврежденные субстраты и подавляя образование цитотоксичных агрегатов.

Обезвоживание, особенно в форме экстремальной дегидратации, представляет другой тип стресса. Потеря воды ведет к уплотнению цитоплазмы, изменению диэлектрических свойств среды и нарушению гидратационной оболочки макромолекул. В условиях ангидробиоза важна не только ликвидация возникших повреждений, но и длительная стабилизация белков и мембран при почти полном отсутствии свободной воды (Hibshman et al., 2020). В различных модельных системах показано, что при дегидратации HSP могут переходить от преимущественно

реактивного режима работы к превентивному. В таком состоянии они формируют устойчивый протекторный пул, присутствующий до наступления экстремального стресса (Hibshman et al., 2022).

В ряде ангидробионтов показано, что элементы системы белков теплового шока могут быть привлечены к формированию устойчивости к обезвоживанию. У нематод, ракков рода *Artemia* и некоторых насекомых описано повышение экспрессии отдельных представителей семейств HSP70, HSP90 и малых HSP на этапах высыхания и последующей регидратации, что интерпретируется как вклад в сохранение структуры белков и функциональных белковых комплексов в период остановки метаболизма и при выходе из него. На этом фоне представляется интерес предположение о возможном участии HSP и у *Polypedilum vanderplanki*, однако конкретные механизмы и вклад отдельных представителей этих семейств в обеспечение ангидробиоза у данного вида требуют специального анализа в рамках данной работы.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты исследования

2.1.1. Личинки *Polypedilum vanderplanki* (создание и поддержание лабораторной колонии, инбридинг, условия содержания, голодание перед экспериментами)

В работе применялась лабораторная колония, поддерживаемая в условиях контролируемого цикла размножения (температура 27–28 °C, фотопериод 13ч/11ч свет и темнота). Колония была инбредна не менее чем в течение четырёх поколений, что обеспечивало генетическую однородность исследуемого материала. Насекомые содержались в аквариальных инкубационных системах, имитирующих их естественную среду обитания, при стабильной температуре и контролируемом цикле освещенности. Вода регулярно обновлялась, питание было стандартным. Перед отбором биологического материала личинки подвергались 24-часовому голоданию, что позволяло минимизировать вариации, связанные с состоянием кишечника и метаболическими колебаниями. Эти стандартизованные условия использовались при подготовке образцов для экстракции ДНК и РНК, а также для белкового и метаболомного анализа.

2.1.2. Клеточная линия Pv11 (условия культивирования, состав среды, пассирование, особенности ангидробиотической линии)

В рамках исследований использовалась уникальная клеточная линия Pv11, полученная из эмбрионов *Polypedilum vanderplanki* и обладающая способностью к индукции ангидробиоза в условиях *in vitro*.

Культивирование клеток осуществлялось в среде IPL-41 (Thermo Fisher Scientific), модифицированной добавлением 2,6 г/л триптомозофосфатного бульона BactoTM, 10% (об./об.) эмбриональной бычьей сыворотки и 0,05% (об./об.) антибиотик-антимикотического комплекса, включающего 50 МЕ/мл пенициллина, 125 нг/мл амфотерицина В и 50 мкг/мл стрептомицина. Поддержание клеточной линии проводилось при стандартных условиях инкубирования; субкультивирование осуществлялось с периодичностью в семь дней.

2.2. Индукция стрессовых воздействий. Дегидратация и регидратация (протоколы ангиодробиоза)

Для моделирования ангиодробиоза использовались как личинки *Polypedilum vanderplanki*, так и клеточная линия Pv11. Процедура дегидратации осуществлялась по протоколу, предложенному Watanabe и соавт. (Watanabe et al., 2002). Личинки на завершающей стадии развития помещали в чашки Петри на фильтровальную бумагу, предварительно смоченную 0,44 мл дистиллированной воды. Далее чашки переносили в эксикатор, заполненный силикагелем, где образцы выдерживались в течение 48 часов при относительной влажности ниже 5%. Такой режим обеспечивал мягкую, постепенную дегидратацию, приводящую к снижению содержания воды до 3–7% от массы личинок. Регидратация проводилась путём полного погружения образцов в дистиллированную воду.

Дегидратация клеточной линии Pv11 проводилась в два этапа. На первом этапе клетки инкубировали в среде прекондиционирования, содержащей 0,6 М трегалозы и 10% полной среды IPL-41, в течение 48 часов при температуре 25 °С. Затем клетки суспендировали в 400 мкл той же среды при концентрации 1×10^8 клеток/мл, равномерно распределяли в

чашке Петри и помещали в эксикатор с относительной влажностью ниже 10% на 10 суток. Регидратацию осуществляли добавлением 1 мл свежей полной среды IPL-41 (Watanabe et al., 2019).

2.3. Физико-химические стрессоры

Для оценки перекрёстной устойчивости к различным типам стрессорных воздействий был применён комплекс физических и химических факторов, сопоставимых по интенсивности или превосходящих условия естественной среды обитания. Выбор стрессоров был направлен на моделирование различных аспектов повреждающего воздействия и активации защитных клеточных механизмов.

2.3.1. Ионизирующее излучение

Гидратированные личинки помещались на дно пластиковых чашек Петри, покрытых полиимидной плёнкой и герметизированных парафильмом во избежание потерь влаги. Образцы подвергались облучению ионным пучком ${}^4\text{He}$ с энергией 50 МэВ и $\text{LET}^\infty = 16,2 \text{ кэВ/мкм}$ в дозе 70 Гр, доставленным с использованием циклотрона с азимутально изменяющимся полем (AVF) на ионном ускорителе Такасаки Японского агентства по атомной энергии. Контрольные группы подвергались имитации процедур (sham-irradiation) в идентичных условиях.

2.3.2. Космическое излучение

В рамках серии экспериментов «Биориск» дегидратированные личинки размещались на внешней поверхности Международной космической станции, где находились в течение 13 месяцев. Воздействие включало факторы открытого космоса — вакуум, орбитальные температурные

колебания, а также ионизирующее излучение низкой околоземной орбиты. После возвращения на Землю проводилась регистрация образцов и анализ их жизнеспособности и репродуктивного потенциала.

2.3.3. Ультрафиолетовое космическое излучение

Высушенные личинки также участвовали в эксперименте «EXPOSE-R», предполагающем экспозицию на внешней поверхности МКС с прямым воздействием солнечного УФ-излучения и факторов космической среды. Продолжительность экспозиции составила 22 месяца. По возвращении проводились регистрация и стандартная оценка жизнеспособности.

2.3.4. Двуцепочечные разрывы ДНК

Для оценки степени ядерных повреждений клетки подвергались электрофорезу, после чего ДНК окрашивалась бромидом этидия. Анализ проводился на основании изображений 200 случайно выбранных клеток от каждой личинки (три независимых слайда). Содержание ДНК в «голове» (интактные фрагменты) и «хвосте» (фрагментированная ДНК) кометы определялось с использованием программного обеспечения *CometScore*.

2.3.5. Гиперосмотический стресс

Клетки линии Pv11 и личинки инкубировались в среде с добавлением NaCl (до 600 мМ) или маннита (600 мМ) в течение 2–24 часов. Эти условия моделировали осмотическую нагрузку, аналогичную процессам, сопровождающим естественное обезвоживание.

2.3.6. Трегалоза

Для оценки протекторной роли трегалозы клетки Pv11 и личинки предварительно инкубировались в растворах сахарида (100–200 мМ), как в условиях покоя, так и с последующей дегидратацией. Эффективность оценивалась по экспрессии молекулярных маркеров защитного ответа.

2.3.7. Окислительный стресс (паракват)

Воздействие параквата (20 мкМ) в течение 1–6 часов применялось для индукции образования активных форм кислорода и моделирования окислительного стресса. Оценка реакции клеток проводилась по активности антиоксидантных систем.

2.3.8. Тепловой шок

Личинки и клетки Pv11 подвергались кратковременному воздействию температуры 42 °С в течение 30–60 минут. Целью было индуцирование экспрессии белков теплового шока и изучение их роли в стабилизации белков и мембран в условиях экстремальных воздействий.

2.4. Выделение и подготовка биоматериала

2.4.1. Экстракция ДНК у личинок *Polypedilum vanderplanki* клеток линии Pv11

ДНК выделяли как из личинок *Polypedilum vanderplanki*, так и из клеточной линии Pv11. Для личинок применяли классический СТАВ-метод. Протокол экстракции выполняли на образцах, прошедших цикл дегидратации/регистрации. Личинки последней стадии развития промывали в PBS и подвергали механической гомогенизации в буфере на

основе Tris-HCl (10 мМ, pH 8.0), EDTA (25 мМ) и SDS (0,5%) с добавлением восстановителя β -меркаптоэтанола. Белки удаляли протеиназой K (0,1 мг/мл, 55 °C, в течение ночи), ДНК экстрагировали фенол-хлороформом с последующим центрифугированием и сбором надосадочной жидкой фазы, содержащей нуклеиновые кислоты. ДНК осаждали изопропанолом, повторно центрифугировали, собирали хлопьевидный осадок и промывали 70% этанолом для удаления солей, остатков СТАВ буфера. Качество выделенной ДНК контролировали спектрофотометрически (отношение A260/280 вблизи 1,8–2,0; A260/230 не ниже ~2,0), а также визуализировали на агарозном геле для подтверждения целостности и отсутствия деградации

Для линии Pv11 применяли колонковый метод на силикагелевых матрицах (NucleoSpin Tissue, Macherey-Nagel). Клетки собирали, лизировали в буфере с добавление протеинкиназы K и центрифугировали. Надосадочную фазу с гуанидинсодержащими связывающим буфером наносили на колонку, обеспечивая связывания ДНК с сорбентом, колонку последовательно промывали с этанолом для удаления белков и низкомолекулярных примесей, затем выводили ДНК в жидкую фазу низкосолевым раствором/водой. Концентрацию определяли флуориметрически, целостность оценивали электрофорезом

2.4.2. Выделение РНК у личинок *Polypedilum vanderplanki* клеток линии Pv11

Выделение РНК проводили у личинок *P. vanderplanki* после дегидратации/регистратации и у Pv11 после воздействия различных стрессоров (UVC, NaCl, маннит, трегалоза, паракват, тепловой шок). Личинок гомогенизировали и из общего лизата выделяли тотальную РНК фенол-гуанидиновым реагентом TRIzol (Life Technologies), после чего очищали на силикагелевых колонках RNeasy Mini Kit (Qiagen) с

обязательной DNase-обработкой. Для «сухих» образцов особое внимание уделяли быстрой первичной регидратации (≤ 10 мин на льду), после чего немедленно вносили лизирующий реагент, чтобы избежать деградации РНК. Органические примеси удаляли стандартным разделением фаз и осаждением РНК, затем колонку промывали буферами набора и РНК элюировали в РНКаза-свободной воде. Интактность оценивали на Agilent 2100 Bioanalyzer, RIN ≥ 7 считался приемлемым порогом. Сбор проб осуществлялся по временным точкам, соответствующим дизайн-схемам RNA-seq: D0 (исходное состояние), D8/16/24 (часы дегидратации), R0.5, R2, R6, R24 (часы после регидратации).

Для линии Pv11 использовали клетки в состоянии Т0 (гидратированные) и Т48 (после 48-часового прекондиционирования трегалозой). Тотальную РНК выделяли из клеточных пеллетов с использованием набора RNA Plus (Takara), геномную ДНК удаляли обработкой ДНКазой TURBO DNase (Thermo Fisher), после чего готовили библиотеки NGS с помощью модуля магнитной изоляции мРНК NEBNext Poly(A) (New England BioLabs) и набора для подготовки РНК-библиотеки NEBNext Ultra II для Illumina (New England BioLabs)

2.4.3. Получение образцов для белкового и метаболомного анализа

Для измерения метаболитов образцы личинок гомогенизировали в метаноле, содержащего внутренние стандарты, а затем, после смешивания хлороформом и водой с последующим центрифугированием. Экстракт анализировали с использованием капиллярного электрофореза времяпролетной масс-спектрометрии (CE-TOFMS) в двух режимах для катионных и анионных метаболитов. Пики, обнаруженные при анализе CE-TOFMS, были выделены с использованием программного обеспечения автоматической интеграции MasterHands. Пики были аннотированы

панелью, включающей 302 референса из пакета в базе данных метаболитов НМТ на основе их времени миграции определенных с помощью TOFMS. Анализ данных метаболического профиля проводился с использованием пакета MetaboAnalyst. Статистический анализ проводился с помощью однофакторного дисперсионного анализа для выявления метаболитов, которые значительно изменялись по крайней мере в один момент времени. Для попарного сравнения временных точек применялся критерий Фишера. Для реконструкции метаболических путей и интеграции с данными транскриптомики мы использовали базу данных KEGG (Киотская энциклопедия генов и геномов) PATHWAY по доступным видам двукрылых вместе с поиском BLASTр.

2.4.4. Подготовка образцов для измерения антиоксидантной активности личинок *P. vanderplanki*

Антиоксидантную активность исследовали на личинках во время обезвоживания или регидратации с использованием набора для анализа антиоксидантной активности, где в качестве источника АФК использовали гипоксантин-ксантиноксидазные системы. Измеряли генерацию хемиллюминесценции в результате реакции между генератором супероксида и светящимся веществом МПЭК и ее распад в присутствии сырой жидкости из гомогенизированной одиночной личинки с аналитическим буфером. Анализ активности проводился с использованием системы UHPLC UltiMate 3000, оснащенной реакционной колонкой Acclaim 120.

2.4.5. Трансфекция клеток Pv11

Клетки Pv11 трансфецировали с помощью суперэлектропоратора NEPA21 и культивировали в течение 24 ч после трансфекции в стандартных

условиях. Локализацию рекомбинантных белков в культуре клеток исследовали с помощью лазерного конфокального микроскопа.

2.5. Геномный анализ

2.5.1. Подготовка библиотек и секвенирование

Библиотеки готовили на наборе TruSeq DNA Sample Preparation v2 (Illumina) с медианой длины фрагментов около ~397 п.н. Секвенирование проводили на системах Illumina GAIIx/HiSeq 2000 (парное чтение 2×101 п.н.) с добавлением SOLiD 4 (50-п.н. F3/R3) для повышения равномерности покрытия; для закрытия разрывов и улучшения протяжённости использовали длинные чтения PacBio RS (C2). Совокупный объём данных составил порядка ~67,5 миллиардов нуклеотидов, что соответствует 562 кратному покрытию генома *P. vanderplanki*. Контроль длины фрагментов осуществляли на Agilent 2100 Bioanalyzer, концентрации оценивали флуориметрически (Qubit) и кПЦР.

2.5.2. Сборка и улучшение генома

Первичную черновую сборку выполняли de novo (на основе прочтений Illumina PE/MP) с последующим закрытием гэпов данными длинных прочтений PacBio в пайплайне PBJelly (добавочно — валидация стыков по концам фосмидов, секвенированным методом Sanger). Итоговая сборка *P. vanderplanki* имела размер ~104 Мб при scaffold N50 = 1.5 Мб кб, что приблизительно соответствовало предполагаемым размерам генома - 96Мб.

2.5.3. Оценка полноты и качества

Полноту кодирующей части оценивали по 248 «ядровым» эукариотическим генам инструментом CEGMA 2.4 и системой BUSCO v5, основанной на поиске консервативных ортологичных генов. Анализ проводился с использованием базы *diptera_odb10*, включающей эталонные наборы генов насекомых с полным геномом.

2.5.4. Аннотация генома, фильтрация повторных последовательностей и предсказание генов

Повторяющиеся и транспозон-подобные элементы идентифицировали *de novo* с помощью RepeatModeler (интеграция RECON, RepeatScout и Tandem Repeat Finder). Так формировалась собственная библиотека повторов для *P. vanderplanki*. Полученные аннотации использовали для фильтрации повторных последовательностей на этапе структурной аннотации: участки, распознанные как повторы, помечали (soft-mask) и исключали из рассмотрения предсказателем в приоритетном порядке. Такая фильтрация повторных последовательностей снижала вероятность ложных генных моделей в богатых повторами регионах и повышала точность распознавания границ экзонов и инtronов.

Генные модели предсказывали в AUGUSTUS 2.6.1 с итеративным обучением (стартовые параметры — *Anopheles gambiae*), используя «внешние подсказки», повышающие точность разметки: Sanger-EST (маппинг GMAP), 454-EST (сборка MIRA3 с последующим выравниванием BLAT) и RNA-seq (выравнивание TopHat2, сборка транскриптов Cufflinks). Для количественной поддержки экспрессии, риды картировали на геном Bowtie2 (оценка RPKM), что позволяло приоритизировать полноразмерные модели с подтверждёнными сплайс-сайтами.

2.5.5. Источники данных и подготовка внешних наборов для сравнительной геномики

Геномы двукрылых и сборки транскриптомов для сопоставления с *P. vanderplanki* получали из открытых репозиториев Ensembl Metazoa и NCBI с фиксацией версий сборок и аннотаций. Для видов без готовой аннотации выполняли ab initio-предсказание генов в AUGUSTUS (по близкородственным моделям), полноту геномных наборов оценивали в BUSCO (наборы Arthropoda/Diptera). Для стандартизации дальнейших сопоставлений по каждому гену выбирали самую длинную изоформу. Межвидовую кластеризацию проводили в OrthoFinder.

2.5.6. GO-анализ и обогащение функциональных категорий

Функциональные аннотации формировали на основе InterProScan с мэппингом на Gene Ontology; полученные GO-термины сводили в «фон» для последующего статистического сравнения. Наборы «генов интереса» для транскриптомных рядов определяли как десиккационно- отзывчивые: увеличение экспрессии >3-крат между D0 и D24 при RPKM > 10 для более высокого значения. Обогащение GO-категорий оценивали гипергеометрическим тестом (с порогом достоверности $P < 1E-03$; корректировка множественных сравнений), результаты суммировали в таблицах и отображали в MidgeBase совместно с экспрессионными треками.

2.6. Транскриптомный анализ

2.6.1. RNA-seq (Illumina)

Общая РНК выделялась как из целых личинок *P. vanderplanki*, так и из клеточной линии Pv11 с использованием фенол-хлороформных или колонковых методов (в зависимости от партии). Качество РНК контролировалось на приборе Agilent 2100 Bioanalyzer, при этом для дальнейшей работы отбирались образцы с индексом целостности не ниже 7. Концентрация РНК определялась флуориметрическим методом с использованием системы Qubit. Для исключения вариабельности все манипуляции проводились в строго стандартизованных условиях и в одинаковой последовательности.

Из выделенной РНК после деплеции рРНК или обогащения поли-(A)⁺ фракцией готовились кДНК-библиотеки со средним размером вставки 180–500 пар нуклеотидов. Подготовка библиотек осуществлялась по протоколам компании Illumina. Секвенирование выполнялось на системах Illumina HiSeq 2500/4000, NextSeq 500 или NovaSeq с использованием режима парного чтения, что обеспечивало необходимую глубину покрытия для транскриптомного анализа. (данные диссертации)

2.6.2. Дополнительные методы: CAGE-seq, CTR-seq для уточнения транскрипционных стартов и промоторов

Для уточнения транскрипционных стартов и оценки активности промоторов применялся метод CAGE-seq. Тотальная РНК экстрагировалась с использованием реагента RNAiso-Plus, далее проводилась очистка с помощью колонок NucleoSpin. Качество выделенной РНК оценивалось с использованием системы Agilent Bioanalyzer; к дальнейшей работе

допускались образцы с RIN ≥ 7 . Библиотеки CAGE готовились по протоколу FANTOM (RIKEN) (Shiraki et al., 2003; Carninci et al., 2005;). Методика включала обратную транскрипцию кэпированных РНК с захватом 5'-конца (cap-trapping), баркодирование образцов и амплификацию кДНК. Таким образом формировались короткие CAGE-теги, соответствующие истинным транскрипционным стартам. Полученные библиотеки были отсеквенированы на платформе Illumina HiSeq 2500 в режиме одностороннего чтения (50 или 100 п.н.).

Для комплексной аннотации транскриптома и уточнения границ генов использовался метод CTR-seq, являющийся модификацией технологии cap-trapping, адаптированной для секвенирования полноразмерных транскриптов (Yoshida et al., 2022; Deviatiiarov et al., 2017; Makhnovskii et al., 2022).

CTR-seq основан на селективном выделении кэпированных мРНК, что обеспечивает захват их истинных 5'-концов. В отличие от классического CAGE, целью CTR-seq является не формирование коротких тегов, а получение полноразмерных кДНК, охватывающих весь транскрипт от 5' до 3'-конца. Это достигается благодаря использованию модифицированного протокола обратной транскрипции и последующей селекции по целостности кДНК (Carbonell-Sala et al., 2024; Shiraki et al., 2003; Grapotte et al., 2021).

Из выделенной РНК формировались полноразмерные кДНК-библиотеки методом cap-trapping. Для этого использовались биотинилированные адAPTERы, специфически связывающие 5'-кап транскриптов. После обратной транскрипции полученные кДНК закреплялись на стрептавидиновых матрицах, что позволяло удалить

неполные продукты синтеза. Таким образом формировалась библиотека полноразмерных транскриптов.

Библиотеки секвенировались на платформах длинных чтений (PacBio RS II или Oxford Nanopore), что позволяло проходить через полную длину транскрипта и получать данные о структуре изоформ.

CTR-seq использовался при аннотации хромосомной сборки *P. vanderplanki* (версия Pv5.2) для уточнения границ генов, промоторов и сайтов полиденилирования (Yoshida et al., 2022). В совокупности с данными CAGE-seq это обеспечивало высокую точность идентификации транскрипционных стартов и полноразмерных транскриптов, что критически важно для функциональной геномики вида.

2.7. Метаболомный анализ и интеграция с транскриптомикой (база KEGG, BLASTp)

Интеграцию метаболомных данных с транскриптомным профилированием проводили на основе унифицированного биохимического справочника KEGG, что позволяло интерпретировать изменения концентраций метаболитов через активность соответствующих ферментов и путей. В качестве входных данных использовали нормализованные матрицы экспрессии генов для образцов личинок *P. vanderplanki* и клеточной линии Pv11, а также выровненную и нормализованную таблицу метаболитов, включающую значения интенсивностей, времена удерживания и идентификаторы предполагаемых соединений. Для обеспечения сопоставимости наборов была применена единая схема биологического дизайна (контроль, стадии обезвоживания и регидратации), одинаковые критерии контроля качества и единую политику исключения атипичных точек.

Аннотирование генов осуществляли через сопоставление предсказанного протеома *P. vanderplanki* с каталогом KEGG с помощью BLASTp. Для того чтобы присвоение KEGG Orthology (КО) было статистически и биологически обоснованным, использовали пороги e-value не выше 1×10^{-5} , тождественность не ниже 30% и покрытие выравнивания по длине последовательности не ниже 70%. В случаях, когда несколько совпадений удовлетворяли указанным критериям, предпочтение отдавали записям с наличием EC-номера и лучшими совокупными метриками соответствия; многодоменные белки с конфликтующими КО рассматривались отдельно и при неоднозначности исключались из дальнейшего анализа. Для генов с присвоенными КО извлекали соответствующие EC-номера и реакции (R-IDs), формируя таблицу соответствий «ген/белок → КО → EC → реакция», которая служила мостом между транскриптомными данными и картой метаболических путей.

Аннотацию метаболитов проводили последовательно: сначала подтверждали предварительные идентификации по MS/MS-спектрам с использованием эталонных библиотек, далее сопоставляли соединения с записями KEGG Compound (C-IDs), учитывая формулы, изотопные паттерны, время удерживания и биохимическую допустимость в контексте известных путей у *P. vanderplanki*. Соединения с несколькими равновероятными соответствиями марковались как неоднозначные и в интегральные расчёты не включались. Чтобы избежать псевдосвязности сети на уровне путей, в расчётах снижали вклад «универсальных» субстратов и коферментов (например, вода, АТФ/АДФ), нормируя их вес с учётом степени узла.

Далее строили двудольный граф метаболизма на основе KEGG, в котором вершины «гены/ферменты» (через КО/EC) соединялись с реакциями (R-IDs), а те, в свою очередь, — с метаболитами (C-IDs). На

соответствующие вершины накладывались наблюдаемые эффекты: для генов — изменения экспрессии относительно контроля, для метаболитов — изменения интенсивностей. На уровне отдельных путей рассчитывали интегральный показатель активности как устойчивую агрегированную метрику из эффектов по всем задействованным ферментам и метаболитам; при этом использовали робастные схемы усреднения, снижающие влияние выбросов и неоднородности покрытия. Для проверки согласованности сигналов в локальных подграфах оценивали долю рёбер, где знак изменения соответствовал направлению реакции (повышение экспрессии фермента сочетается с ростом продукта и/или снижением субстрата), и сопоставляли полученную долю с нулевой моделью случайной перестановки знаков при сохранении топологии.

Статистическую связь между транскриптомными и метаболомными признаками оценивали двумя комплементарными подходами. Во-первых, для пар «фермент — ближайший метаболит» в пределах одной или двух реакций по KEGG рассчитывали ранговые корреляции по всем образцам/временным точкам; значимость оценивали перестановочными тестами с последующей коррекцией множественных сравнений методом Бенджамина—Хохберга. Во-вторых, проводили независимое обогащение по генам и по метаболитам для каждого пути, а затем объединяли p-значения (метод Фишера либо Стоуффера с весами по числу признаков), что позволяло выявлять маршруты, одновременно поддержанные транскриптомикой и метаболомикой. Путь считался биологически достоверно изменённым, если, помимо статистической значимости, демонстрировал не менее 60% согласованных направлений в локальной сети.

С учётом того, что исследование включало временные серии (вход в ангиидробиоз и выход из него), дополнительно анализировали лаговую

согласованность между динамикой экспрессии ферментов и концентрациями соответствующих метаболитов. Для этого оценивали кросс-корреляции с небольшими временными сдвигами и проверяли, чтобы знак максимальной корреляции не противоречил направлению реакции. Такие связи рассматривались как наиболее информативные кандидаты на причинно согласованные изменения.

Наконец, для приоритетных путей формировали наглядные карты KEGG с наложением экспериментальных данных (цветовое кодирование ферментов и метаболитов по величине изменений и контурам значимости) и компактные локальные субсети для «узловых» молекул. Вся вычислительная часть реализована воспроизводимо на основе открытых инструментов (BLAST+ для сопоставлений, KEGG Mapper/REST для выгрузки справочников, стандартные пакеты статистического анализа), а версии справочников, параметры порогов и все принятые вручную решения зафиксированы в протоколе методов, что обеспечивает прослеживаемость и повторяемость интеграционных выводов.

2.8. Функциональная генетика и клеточная биология

2.8.1. Анализ локализации рекомбинантных белков (конфокальная микроскопия)

Для исследования субклеточной локализации белков в клеточной линии Pv11 конструировались гены-фьюджны с флуоресцентным маркером (AcGFP1), при этом открытая рамка считывания интересующего гена клонировалась в рамке чтения на N- или C-конце AcGFP1 под контролем сильного конститутивного промотора 121 вида *Polypedilum vanderplanki* (Kondratyeva et al., 2022). Трансфекция Pv11 выполнялась электропорацией (NEPA21, NEPA GENE), после чего клетки инкубировали 24 ч в

стандартных условиях культуры перед микроскопией (Voronina et al., 2020). Для верификации компартментной локализации применяли окраски органелл и структур клетки: мембранны — CellVue Claret Far Red; ядра — Hoechst 33258; аппарат Гольджи и ЭПР — набором CytoPainter; колокализацию оценивали по перекрытию сигналов фьюжн-белка и соответствующего красителя (Kondratyeva et al., 2022). Изображения получали на лазерном конфокальном микроскопе ZEISS LSM 780 с использованием стандартных настроек каналов (возбуждение 405/488/633 нм и соответствующие диапазоны эмиссии для синих, зелёных и дальнекрасных меток) (Kondratyeva et al., 2022). Такой подход ранее применялся для систематической оценки локализации семейств PvLEA и PvLIL в Pv11 и зарекомендовал себя как воспроизводимый для анализа распределения по цитозолю, ядру, мембранам и элементам секреторного пути (Kondratyeva et al., 2022).

2.8.2. Характеристика и тестирование промоторов (MidgeBase, люцифераза, SEAP)

Кандидатные промоторные области подбирались по геномным данным *P. vanderplanki*, доступным в MidgeBase (актуальная версия браузера и сборок для рода *Polypedilum*) с последующим извлечением последовательностей регуляторных регионов и их сравнительным анализом перед клонированием в репортёрные конструкции (Voronina, 2020). Для функциональной оценки активности промоторов использовали люциферазный тест в клетках Pv11: фрагменты промоторов клонировали перед геном люциферазы (включая варианты на основе NanoLuc), а для нормализации транзактивности совместно экспрессировали секрецируемую эмбриональную щелочную фосфатазу (SEAP). Активность люциферазы измеряли через 48 ч после трансфекции и нормировали на активность SEAP

в культуральной среде (Miyata et al., 2021). Такой «дуальный» дизайн (люцифераза / SEAP) был использован для демонстрации высокой и межлинейной консервации активности промотора 121 и для сопоставления с OpIE2, BmA3 и Bmhsp90 в различных насекомых клеточных линиях, включая Pv11 (Miyata et al., 2019). В качестве дополнительных конститутивных драйверов экспрессии применялся промотор PvGapdh, впервые верифицированный в Pv11 при создании стабильных линий с экспрессией GFP и отработке методик трансфекции и РНК-интерференции (Sogame et al., 2017). Для долговременной и воспроизводимой экспрессии репортёров и трансгенов использовали интеграцию кассет в геномные «безопасные гавани», идентифицированные специально для Pv11. Показано, что такие локусы обеспечивают стабильную экспрессию без ущерба для ключевых фенотипов, включая способность к ангидробиозу, что делает их предпочтительными площадками для тестов промоторов и создания эталонных линий (Miyata et al., 2022).

2.9. Анализ антиоксидантной активности

Для оценки суммарной антиоксидантной ёмкости у личинок *Polypedilum vanderplanki* применяли хемилюминесцентный метод на основе системы гипоксантин–ксантиноксидаза с детекцией сигнала реагентом MPEC (2-метил-6-(4-метоксифенилэтинил) имидазопиразинон) в составе набора CLETA-S (ATTO, Tokyo). Анализировали разные физиологические состояния личинки: гидратированный контроль, стадии контролируемой десикации («D-t ч», где t — длительность обезвоживания в часах) и стадии регидратации («R-t ч», t — время после начала регидратации). Такая разметка временных точек обеспечивает сопоставимость с опубликованными протоколами для ангидробионтных хирономид и

позволяет отслеживать динамику антиоксидантной защиты в переходных состояниях «гидратация → дегидратация → гидратация».

Принцип метода заключается в генерации супероксид-анион-радикала (O_2^-) ферментной парой гипоксантин-ксантиноксидаза и последующей регистрации хемилюминесцентного отклика при взаимодействии активных форм кислорода с МРЕС. Добавление биологического образца, содержащего низкомолекулярные и ферментные антиоксиданты, приводит к дозозависимому затуханию хемилюминесценции в результате реакции между генератором супероксида и светящимся веществом МРЕС. Величина подавления светосуммы отражает интегральную антиоксидантную активность.

Биоматериал для исследования готовили индивидуально из одной личинки на образец, что позволяло минимизировать внутригрупповую вариабельность и избежать усреднения эффектов. Личинок из соответствующей точки (контроль-t, D-t, R-t) быстро переносили на лёд и гомогенизировали в буфере набора CLETA-S (50–150 мкл в зависимости от массы личинки). Кратко центрифугируя гомогенат при 4 °C (2–3 мин, низкая скорость) удаляли грубые фрагменты кутикулы. Надосадочную фракцию немедленно использовали в реакции.

Реакционную смесь формировали согласно инструкции производителя: буфер набора, субстрат (гипоксантин), ксантиноксидаза и МРЕС. Помимо исследуемого образца каждое измерение включало параллельный набор стандартных и контрольных лунок/кувет: 1) “референтный сигнал” — чистая реакционная смесь без добавления биообразца (для определения верхней границы хемилюминесцентного сигнала и оценки фона прибора); 2) валидационный образец — положительный контроль (эпигаллокатехин-галлат или хлорогеновая

кислота) сериями разведений для проверки линейность подавления хемилюминесценции и пригодность реагентов/детектора; 3) “контрольный образец” — смесь с гомогенатом гидратированной личинки (для фиксации базового уровня антиоксидантной активности); 4) “экспериментальный образец” «D-t или R-t». Регистрацию хемилюминесценции запускали немедленно на люминометре, инициацию реакции осуществляли добавлением фермента/субстрата в последнюю очередь, фиксируя либо кинетическую кривую (интенсивность во времени), либо интегральную светосумму за заданный интервал.

Показатель относительной антиоксидантной способности вычисляли как процент ингибирования сигнала относительно “референтного сигнала” по формуле:

$$\text{Ингибирование (\%)} = 100 \times \left(1 - \frac{I(\text{образец})}{I(\text{референс})}\right),$$

где I (образец) - пищевая или интегральная интенсивность в присутствии гомогената личинки, I (референс) - интенсивность чистой реакционной смеси. Значение представляли в расчёте “на личинку”, дополнительно (по необходимости межсерийной сопоставимости) нормализовывали на общее содержание белка в образце (метод Бредфорда), предоставляя параллельно показатель в ед/мг белка. Для каждого состояния выполняли не менее трёх биологических повторов (три независимые личинки), каждый биообразец измеряли в двух-трех технических повторах.

Интерпретация результатов опиралась на то, что данный подход оценивает интегральную способность образца инактивировать $O_2^{\bullet-}$, не разделяя вклад отдельных компонентов антиоксидантной системы. Следовательно, изменения показателя могут отражать как вариации в уровне низкомолекулярных антиоксидантов (аскорбат, глутатион и др.), так

и в активности ферментных путей (СОД, каталаза, глутатионпероксидаза) (Nesmelov et al., 2018). Такой подход обеспечивает высокую чувствительность к динамике антиоксидантной защиты в критические переходы ангидробиоза, что делает её оптимальной для серийных сравнений «контроль → дегидратация → регидратация» на уровне отдельной личинки.

2.10. Биоинформационическая обработка данных

2.10.1. Контроль качества, мэппинг и подсчёт транскриптов

Первичную оценку качества сырых чтений выполняли по стандартным метрикам (распределения Phred-баллов, содержание адаптеров/оверрепрезентированных последовательностей, дупликации, композиция нуклеотидов). Индивидуальные отчёты формировались в FastQC, а сводные — в MultiQC (Ewel et al., 2016). Адаптерные последовательности и низкокачественные концы удаляли Trimmomatic с унифицированными параметрами по всем партиям, при необходимости применяли cutadapt (Bolger et al., 2014;). Повторный контроль качества осуществляли теми же средствами для подтверждения воспроизводимости.

Очищенные чтения выравнивали на хромосомную сборку и аннотацию *P. vanderplanki* Pv5.2 сплайс-осведомлёнными выравнивателями STAR и/или HISAT2 (PMID: 31375807), задавая для насекомых допустимые интервалы инtronной длины и включая поиск межэзонных стыков (Yoshida et al., 2022; Dobin et al., 2013; Kim et al., 2019). Для каждой библиотеки фиксировали долю уникально мэпированных чтений, уровень мульти-мэппинга и направленность протокола (strandedness), оцениваемую в RSeQC (Wang et al., 2012). Подсчёт сигналов на уровне генов осуществляли featureCounts, для уровня транскриптов — вероятностными

квантфикаторами RSEM или Salmonc включёнными моделями коррекции смещений (Liao et al., 2013; Li et al., 2011; Patro et al., 2017). Все версии ПО, параметры и контрольные суммы индексов протоколировались для воспроизводимости.

2.10.2. Кластеризация генов, ортологический анализ

Нормализованные матрицы счётов переводили в унифицированное пространство (лог-масштаб со стабилизацией дисперсии), отбирали высоковариабельные гены и проводили кластеризацию (иерархическую по 1-ρ Спирмена либо *k-means/PAM* после понижения размерности), интерпретируя кластеры как со-регулируемые модули экспрессии. Методологическая логика и контроль артефактов соответствовали современным рекомендациям по обработке RNA-seq-данных (Conesa et al., 2016). Для эволюционно-сопоставительного контекста строили ортогруппы с помощью OrthoFinder — базовая версия и расширение с филогенетической инференцией ортологов/генных деревьев (Emms et al., 2015; Emms et al., 2019). Полноту наборов генов контролировали BUSCO v5, что позволяло отличать биологически обусловленное отсутствие генов от несовершенств аннотации (Manni et al., 2021).

2.10.3. GO-анализ, KEGG-аннотация

Функциональная интерпретация геномных/транскриптомных списков проводилась через обогащение по терминам Gene Ontology с использованием проверенных алгоритмов, учитывающих топологию графа GO, а также пакета clusterProfiler для ORA/GSEA и визуализации (Alexa et al., 2006; Yu et al., 2012; Wu et al., 2021). Основанием служил полный список аннотированных генов Pv5.2.x и множественная проверка гипотез — по Бенджамини–Хохбергу. Для картирования на пути KEGG использовались

КО-идентификаторы, присвоенные на основе сходства аминокислотных последовательностей (BLAST+ или DIAMOND) с последующим отображением в KEGG PATHWAY/BRITE (Kanehisa et al., 2000; Kanehisa et al., 2017; Camacho, 2009). При необходимости результаты проверялись интерактивными средствами KEGG Mapper.

2.11. Статистический анализ

Числовые данные обрабатывали в GraphPad Prism (GraphPad Software). Значения представляли как среднее ± стандартное отклонение либо как среднее ± 95% доверительный интервал. Для парных сравнений двух групп использовали двусторонний t-критерий Стьюдента ($p < 0,05$). При сравнении трёх и более групп выполняли одно- или двухфакторный ANOVA с последующим пост-хок тестом Тьюки ($p < 0,05$). В задачах сравнения распределений (биофизические свойства белков, небалансовые метрики) применяли двусторонний критерий Уилкоксона с поправкой на непрерывность, для множественных сравнений использовали корректировки, встроенные в соответствующие пост-хок процедуры.

Для транскриптомных и сравнительно-геномных анализов использовали среду R и профильные пакеты. Картирование ридов выполняли Bowtie2/HISAT2 с подсчётом чтений (HTSeq). Дифференциальную экспрессию оценивали edgeR с последующей визуализацией и сводной статистикой в R; функциональные обогащения по Gene Ontology/InterPro рассчитывали с учётом длины транскриптов методом Уоллениуса (goseq). В отдельных задачах выделения сильно индуцированных генов применяли пороговые критерии (например, >3-кратное изменение при RPKM > 10). Уровень статистической значимости для всех тестов принимали $p < 0,05$, если не указано иное.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1. Исследование устойчивости личинок *Polypedilum* к факторам космической среды

3.1.1. Выживаемость личинок после космического полёта

Для расширения понимания пределов толерантности личинок хирономид к широкому спектру экстремальных факторов среды, в рамках реализации российских космических программ была проведена серия экспериментов с ангидробиотическими личинками *Polypedilum vanderplanki*, направленных на исследование устойчивости многоклеточных организмов к условиям космоса. Исследования включали как хранение образцов в герметичных отсеках на борту Международной космической станции в течение 30 и 210 суток, так и их длительное экспонирование во внешней среде — в течение 12 месяцев в специальных контейнерах, размещённых на внешней поверхности модуля «Пирс» (Рисунок 3). Последний вариант обеспечивал воздействие факторов открытого космоса в полном объёме. Эти эксперименты были выполнены в рамках проекта "An anhydrobiotic insect, *Polypedilum vanderplanki*, as a tool for astrobiology" и стали важным шагом в оценке жизнеспособности ангидробионтов в экстремальных внеземных условиях (Gusev et al., 2008; Novikova, 2011).

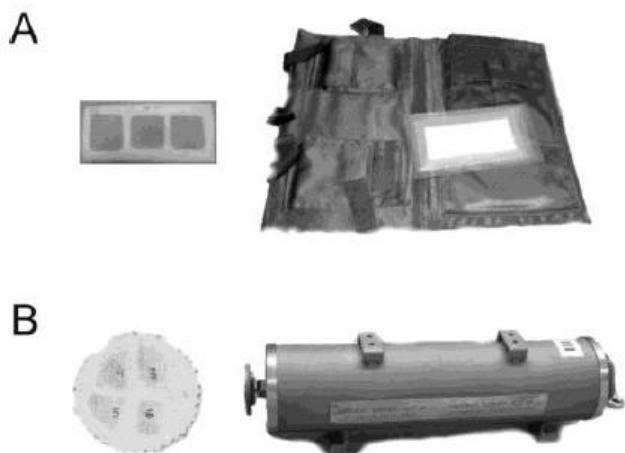


Рисунок 3 – Упаковка ангидробиотических личинок *P. vanderplanki* для космических экспериментов: (А) внутреннее размещение на МКС (30 и 210 суток), (В) внешний контейнер эксперимента «БИОРИСК» (12, 24 и 48 месяцев).

Полученные данные свидетельствуют о том, что после 30 и 210 суток пребывания в герметичных отсеках Международной космической станции личинки сохраняли высокую жизнеспособность. После возвращения на Землю и последующей регидратации они демонстрировали степень выживаемости, сопоставимую с контрольными образцами, находившимися в наземных условиях. Более того, последующее развитие особей проходило без отклонений и охватывало все ключевые стадии жизненного цикла — от окукливания до выхода имаго и формирования жизнеспособного потомства. Эти результаты указывают на сохранность онтогенетических программ *Polypedilum vanderplanki* в условиях космического полёта (Novikova et al., 2011).

Особое значение имел длительный эксперимент в рамках программы «БИОРИСК», когда личинки находились во внешнем контейнере на обшивке модуля «Пирс» МКС в течение 24 месяцев. В этих условиях образцы подвергались прямому воздействию комплекса экстремальных факторов: вакуума, колебаний температуры и космического излучения

(Indo et al., 2015). Несмотря на столь неблагоприятные условия, реактивация личинок после регидратации происходила в течение нескольких часов, и дальнейшее развитие шло без статистически значимых отклонений от контроля. Сохранность жизненного цикла в течение года пребывания во внешней космической среде свидетельствует о том, что ангидробиоз обеспечивает не только устойчивость к обезвоживанию, но и универсальную защиту биомолекулярных структур от повреждений, связанных с космосом (Novikova et al., 2011; Gusev et al., 2008; Novikova et al., 2015).

Факт выживания личинок в условиях космического полёта следует рассматривать в контексте ранее установленных данных о радиоустойчивости *P. vanderplanki*. В лабораторных опытах показано, что в «сухом» состоянии личинки переносят дозы гамма-излучения свыше 5 кГр и сохраняют способность к метаморфозу, тогда как в «влажном» состоянии летальные исходы наблюдаются уже при дозах порядка 3–3,5 кГр. Сходство фенотипических проявлений устойчивости при облучении и в условиях космоса позволяет рассматривать радиорезистентность как составную часть эволюционно выработанного механизма, сопряжённого с ангидробиозом. Вероятно, ключевым фактором является способность организма не только переносить массивные повреждения ДНК, но и эффективно восстанавливать её целостность при возвращении в активное состояние (Gusev et al., 2010; Ryabova et al., 2017).

Полученные результаты сопоставимы с ограниченным числом задокументированных случаев выживания многоклеточных организмов в условиях открытого космоса. Ранее способность к восстановлению после космической экспозиции демонстрировалась у тихоходок и отдельных видов нематод (Chatani et al., 2016; Sugimoto et al., 2016). Однако в случае *Polypedilum vanderplanki* показано не только выживание особей, но и успешное прохождение полного жизненного цикла, включая формирование

жизнеспособного потомства. Это принципиально отличает исследуемый объект от большинства моделей, применяемых в астробиологических исследованиях, и выводит его на особый уровень. В отличие от типичных эукариотических организмов, личинки *P. vanderplanki* способны выдерживать не изолированное воздействие одного стрессора, а совокупность экстремальных факторов космической среды, при этом сохраняя как геномную стабильность, так и целостность онтогенетических программ (Novikova et al., 2011).

Таким образом, полученные данные убедительно демонстрируют, что ангидробиоз у *P. vanderplanki* представляет собой универсальный механизм адаптации, обеспечивающий выживаемость в условиях экстремального стресса, включая экспозицию в открытом космосе. Сочетание высокой радиоустойчивости и способности к длительному пребыванию в обезвоженном состоянии позволяет рассматривать данный вид как уникальную модель для изучения молекулярных основ геномной защиты и устойчивости многоклеточных организмов к космическим условиям (Novikova et al., 2011; Gusev et al., 2010).

3.1.2. Радиационная устойчивость в условиях «сухого» и «влажного» состояния

Сравнительный анализ воздействия ионизирующего излучения с различным линейным переносом энергии (низко-LET γ -квантов и высоко-LET ионов гелия) на личинок *Polypedilum vanderplanki* выявил принципиальные различия в характере ДНК-повреждений и динамике их reparации у физиологически активных («влажных») и ангидробиотических («сухих») особей (Ryabova et al., 2017).

Результаты анализа методом ДНК-комет, проведённого на клетках жирового тела после воздействия дозы 70 Гр, показали, что у

гидратированных личинок восстановление ДНК до уровня, сопоставимого с интактным контролем, происходит в течение 24 часов при воздействии γ -излучения. Однако при облучении ионами ${}^4\text{He}$ ($\text{LET}^\infty = 16,2 \text{ кэВ/мкм}$) восстановление структуры ДНК значительно замедлено: возвращение к базовому уровню наблюдается только спустя до 168 часов (Ryabova et al., 2017).

Примечательно, что у неиррадиированных «сухих» личинок сразу после регидратации фиксируется выраженная фрагментация ДНК, уровень которой сопоставим с тем, что наблюдается у образцов, облучённых ${}^4\text{He}$ при дозе 70 Гр. Тем не менее, восстановление у ангидробиотических особей происходит быстрее: физиологическое состояние достигается уже приблизительно через 96 часов, что указывает на высокую эффективность репарационных механизмов после выхода из «сухого» состояния (Рисунок 4) (Ryabova et al., 2017).

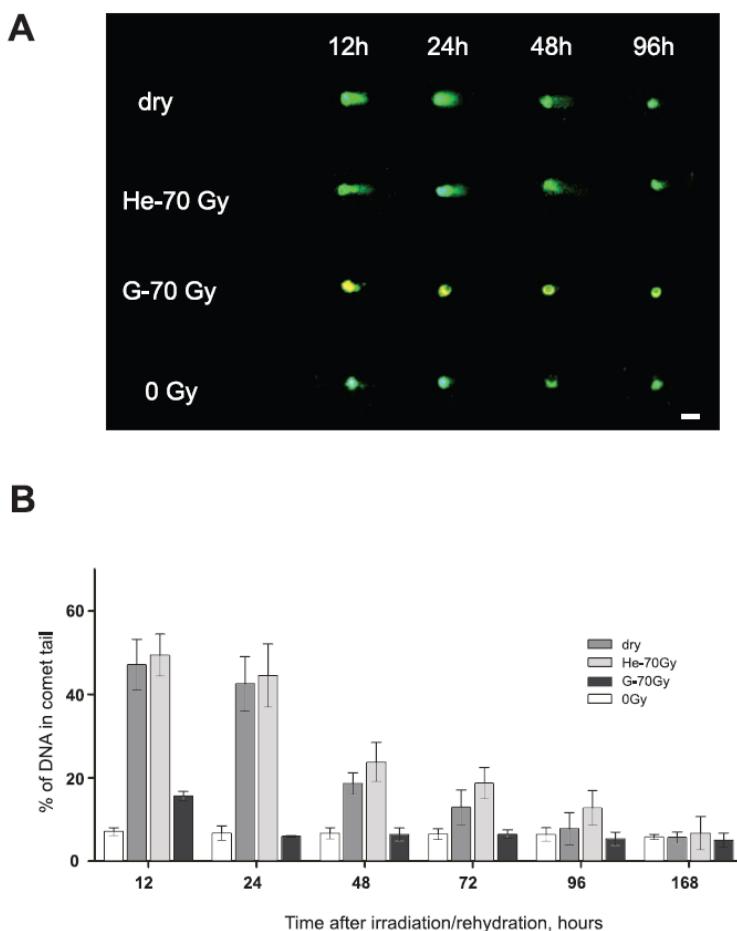


Рисунок 4 – Временной ход восстановления ДНК в клетках жирового тела гидратированных личинок после облучения ионами ${}^4\text{He}^+$ и γ -квантами, а также у личинок после регидратации по завершении трёх месяцев ангиобиоза. (А) Репрезентативные изображения «комет» ядерной ДНК из клеток жирового тела личинок в течение 96-часового периода восстановления после γ -облучения (G-70 Гр) и облучения ионами ${}^4\text{He}^+$ (He-70 Гр) гидратированных личинок, а также после ангиобиоза (dry: дегидратированные личинки). Линия «0 Гр» соответствует интактным гидратированным личинкам. Масштабная линейка = 5 мм. (В) Доля ДНК в «хвосте» кометы в клетках жирового тела личинок после γ -облучения или облучения ${}^4\text{He}^+$, а также после регидратации по завершении ангиобиоза. Погрешности — среднее $\pm 95\%$ ДИ.

Эти данные указывают, что ангиобиоз сопровождается массивными двуцепочечными разрывами, однако «сухое» состояние формирует условия для эффективной последующей reparации уже в

водной фазе развития. Более того, даже при длительном хранении в «сухом» состоянии (до 14 мес. при комнатной температуре) дополнительного накопления ядерных повреждений не фиксируется, что подчеркивает стабильность «законсервированного» генома до момента запуска репарации при регидратации (Gusev et al., 2010; Ryabova et al., 2017).

Функциональным проявлением данных механизмов является повышенная радиорезистентность анgidробиотических личинок по сравнению с гидратированными. Серия радиационных экспериментов показала, что в «сухом» состоянии организмы демонстрируют повышенную выживаемость и способность к полноценному развитию как после воздействия излучения с низким LET, так и с высоким LET. Устойчивость проявляется уже на этапе индукции анgidробиоза и сохраняется сразу после регидратации, что свидетельствует об активности защитных механизмов как на входе, так и на выходе из анgidробиотического состояния. При облучении дозой 70 Гр, вне зависимости от типа ионизирующего излучения, не фиксировалось значимого ингибирующего эффекта на последующее развитие. Это обосновывает использование данной дозы в качестве стандартной при сравнительном анализе молекулярных ответов на облучение и анgidробиоз (Ryabova et al., 2017).

3.1.3. Повреждения и защита ДНК при анgidробиозе и радиации

Электронно-микроскопическое исследование показало, что анgidробиоз сопровождается заметной перестройкой ядерной архитектуры в разных типах клеток личинок. В «сухом» состоянии как в клетках жирового тела, так и в скоплениях недифференцированных клеток наблюдается выраженная сегрегация и конденсация хроматина, тогда как у гидратированных личинок хроматин остаётся осмиофильным и дисперсным. Дополнительно описаны деформации и инвагинации ядерной

оболочки в сухих образцах, что согласуется с общей редукцией клеточного объёма при обезвоживании и механической нагрузкой на ядерный контур (Рисунок 5). Подобные изменения иллюстрируют переход к компактной, «консервированной» упаковке генетического материала в ходе процесса ангидробиоза (Gusev et al., 2010).

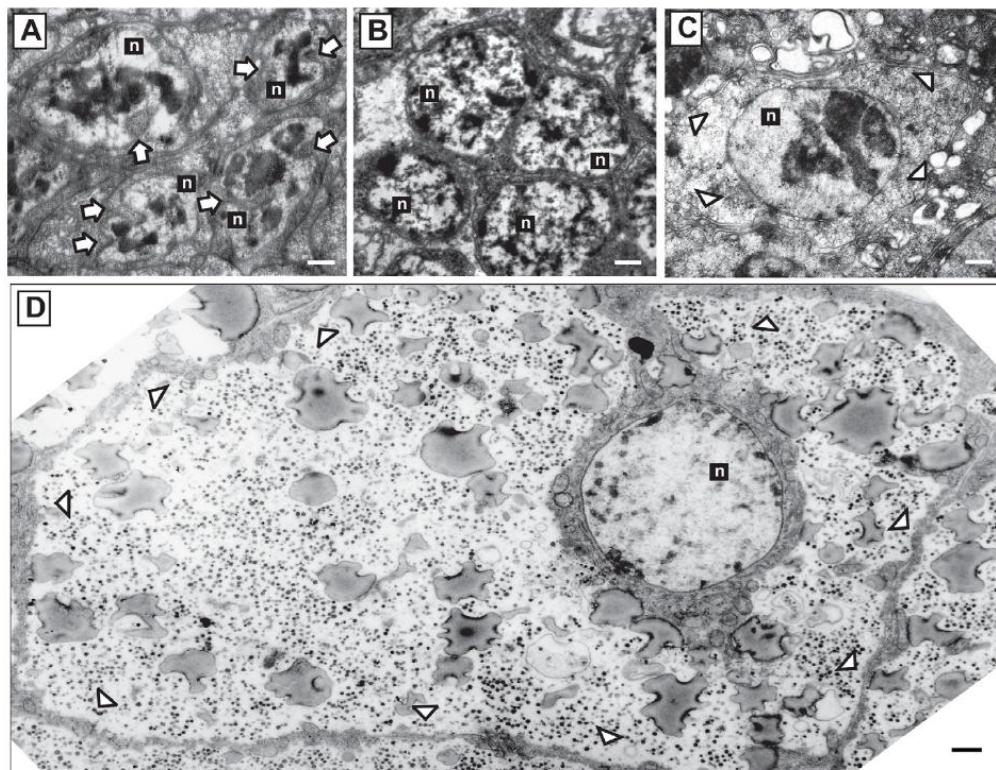


Рисунок 5 – Ультраструктура ядер двух типов клеток у сухих и гидратированных личинок. (А) Недицированные клетки сухой личинки. (В) Недифференцированные клетки гидратированных личинок. (С) Клетки жирового тела сухой личинки. (Д) Целая клетка жирового тела гидратированной личинки. В сухом состоянии хроматин в ядрах обоих типов клеток демонстрирует чёткие признаки сегрегации. Хроматин клеток гидратированных личинок является осмиофильтным и широко распределённым. н — ядра. Масштабная линейка = 1 мкм. Белые стрелки указывают на инвагинации в мембранах ядер (А), белые стрелки с наконечниками — на плазматическую мембрану клеток жирового тела (С, Д).

Сохранение признаков сегрегации хроматина в ранние сроки после восстановления водной фазы можно интерпретировать как структурную консервацию геномного аппарата, позволяющая выдержать период отсутствия метаболизма ценой временного ограничения транскрипционно-репликационной доступности ДНК. Такая «жёсткая» упаковка, вероятно, снижает площадь уязвимости двойной спирали и минимизирует вероятность спонтанных разрывов до тех пор, пока не активируются ферментативные пути репарации после регидратации. В пользу этого сценария говорит и отсутствие признаков массовой гибели клеток на фоне постепенного сокращения «кометных хвостов» — преобладает восстановление, а не элиминация повреждённых клеток (Gusev et al., 2010).

Электронная микроскопия последовательно показывает один и тот же механизм: в сухих личинках хроматин конденсирован и сегрегирован, тогда как в гидратированных — дисперсен и осмиофилен. Этот контраст воспроизводится и в недифференцированных клетках, и в клетках жирового тела, что указывает на системный характер ядерной перестройки у *P. vanderplanki* и согласуется с повышенной радиоустойчивостью личинок в ангидробиозе (Gusev et al., 2010).

Одним из ключевых механизмов защиты повреждения ядерного аппарата является активация системы контроля активных форм кислорода (ROS) при восстановлении метаболической активности. Анализ экспрессии ключевых компонентов антиоксидантной системы показал согласованный ответ при входе в ангидробиоз и специфические различия после облучения разными типами ИИ. По данным qRT-ПЦР, мРНК Cu/Zn-супероксиддисмутазы (*Sod*), каталазы (*Cat*) и глутатионпероксидазы (*Gpx/Per*) возрастали уже к стадии D-8 ч, достигая пика (\approx 8–10-кратного относительно гидратированного контроля) на D-24–D-48 ч. При регидратации транскрипт *Sod* быстро возвращался к контролльному уровню, тогда как *Cat* и *Per* нормализовались лишь к R-12 ч. В «влажных» личинках

γ -облучение индуцировало ранний транзиторный подъём экспрессии всех трёх генов с последующей нормализацией, тогда как после воздействия ${}^4\text{He}$ существенных изменений транскриптов антиоксидантов не отмечено. Функционально это сопровождалось ростом суммарной антиоксидантной активности в ходе дегидратации: максимум в полностью «сухом» состоянии ($\approx 3\text{--}4 \times$ к контролю), с постепенным спадом к уровню контроля к R-24 ч. Дополнительно в «сухих» личинках детектировалась зрелая форма глутатионпероксидазы (по данным 2D-электрофореза и N-терминального секвенирования белка), что согласуется с накоплением антиоксидантов в анgidробиозе (Рисунок 6 А-С) (Ryabova et al., 2017).

На уровне генов репарации ДНК выявлена согласованная активация компонентов, отвечающих за распознавание повреждений (Rad23) и гомологичную рекомбинацию (Rad51), при всех трёх воздействиях: анgidробиозе, гамма- и ${}^4\text{He}$ -облучении. При облучении высоко-LET уже через 1 час наблюдается значительное увеличение экспрессии Rad23 (~в 8 раз) и Rad51 (> в 25 раз), сохраняющееся не менее 48 часов. Для гамма-квантов пик экспрессии наступает позже (через 3 часа) и быстрее снижается. В условиях анgidробиоза экспрессия *Rad23* повышается в процессе дегидратации, тогда как Rad51 достигает максимума через 3 часа после регидратации, что соответствует необходимости устранения накопленных разрывов ДНК после восстановления водной фазы и активации ферментативной системы репарации (Рисунок 6 D-F). Постепенное сокращение хвостов комет при отсутствии признаков массовой клеточной гибели указывает на преобладание процессов репарации, а не апоптоза, несмотря на продолжительность восстановительных процессов (до нескольких суток) (Ryabova et al., 2017; Ryabova et al., 2020).

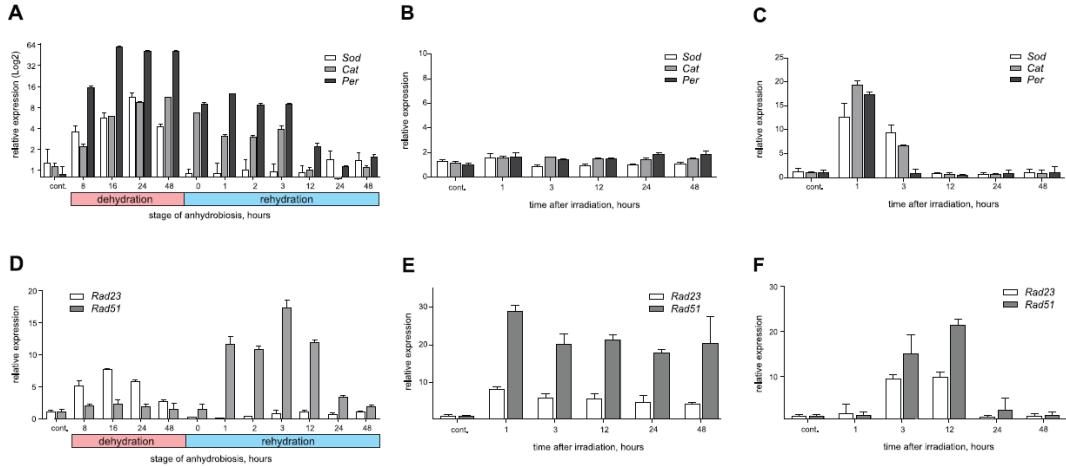


Рисунок 6 – Относительные профили экспрессии мРНК генов, кодирующих антиоксиданты (A–C) и ферменты репарации ДНК (D–F), у личинок *P. vanderplanki* в условиях ангидробиоза (A, D), после облучения тяжёлыми ионами (B, E) и γ -квантами (C, F). Значения уровня мРНК нормированы по экспрессии EF1- α ; относительные изменения рассчитаны относительно контроля (гидратированные личинки, значение = 1). Погрешности приведены как среднее \pm 95% ДИ для трёх биологических повторов.

Помимо антиоксидантного ответа и активации генов репарации, важным элементом системы защиты генома у *P. vanderplanki* является способность белков ангидробиоза прямо стабилизировать ДНК. Наиболее подробно эта функция была изучена нами для PvLEA4, представителя гидрофильных LEA-белков (Ryabova et al., 2016).

В серии дозозависимых экспериментов установлено, что выживаемость личинок определяется как величиной дозы, так и временем после облучения (24–168 ч). Низкие дозы (0,1–0,5 Дж/см²) в первые 24–48 ч не приводили к выраженному снижению жизнеспособности. При возрастании дозы и времени наблюдения различия между группами усиливались: ангидробиотические личинки *P. vanderplanki* в сухом состоянии демонстрировали существенно более высокую устойчивость при 2–8 Дж/см² по сравнению с теми же личинками во влажном состоянии и с неангидробиотическим *P. nubifer* (Рисунок 7). Эти данные согласуются с

предположением, что обезвоживание у *P. vanderplanki* сопровождается накоплением защитных факторов, включая LEA-белки (Ryabova et al., 2016).

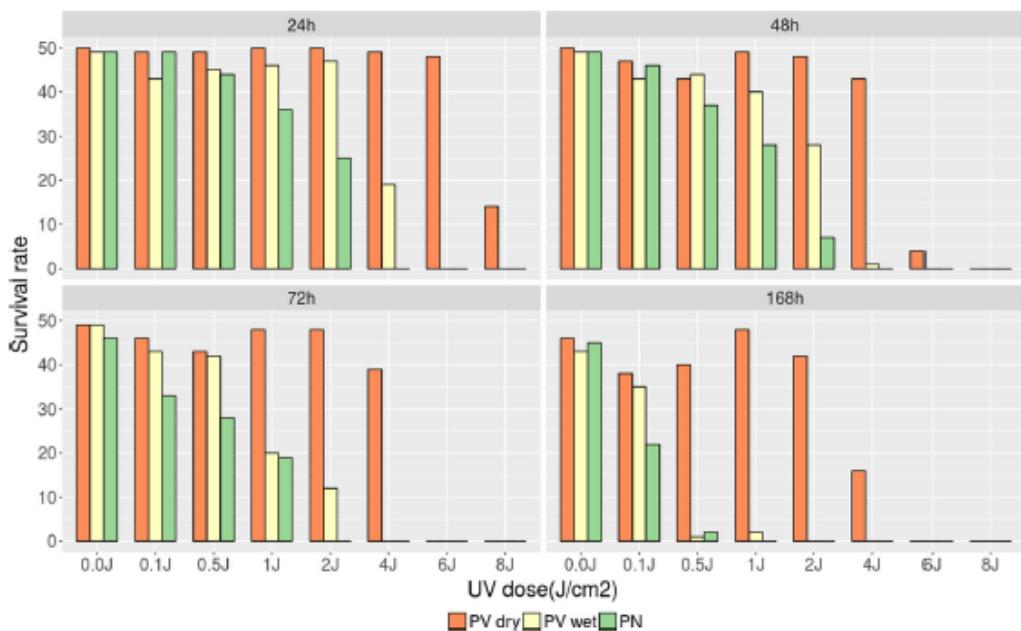


Рисунок 7 – Выживаемость личинок сухих/влажных *P. vanderplanki* и *P. nubifer* после различных доз УФ-облучения в контрольные точки времени.

Чтобы проверить, является ли повышенная устойчивость следствием прямого взаимодействия LEA-белка с ДНК, проведён плазмидный тест: плазмиду pcDNA5/FRT облучали УФ-светом ($0,5\text{--}2$ Дж/см 2) *in vitro* в присутствии или отсутствии белков, затем трансформировали *E. coli* и оценивали число колоний как индикатор сохранности ДНК. В контроле без белков фиксировалась дозозависимая потеря целостности плазмида: при дозах >1 Дж/см 2 рост трансформантов практически отсутствовал (Рисунок 8). Добавление БСА при 1,25 Дж/см 2 давало единичные колонии, тогда как добавление рекомбинантного PvLEA4 обеспечивало появление 42 колоний при той же дозе, при полном отсутствии колоний в контроле без белка

(Рисунок 9). Таким образом, PvLEA4 проявляет самостоятельную ДНК-стабилизирующую активность и снижает УФ-индуцированную деградацию молекулы (Ryabova et al., 2016).

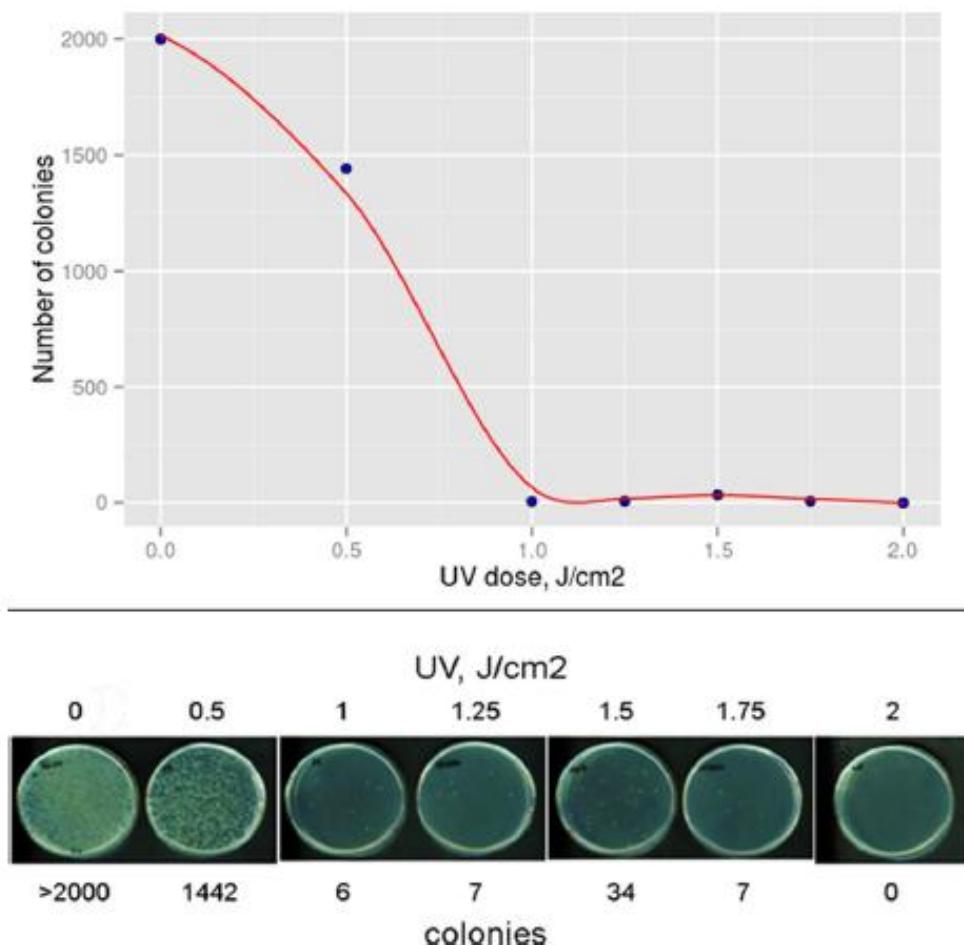


Рисунок 8 – Рост трансформированных клеток *E. coli* на селективной среде после трансфекции УФ-облучённых плазмид (дозозависимое подавление роста при ≥ 1 Дж/см²).

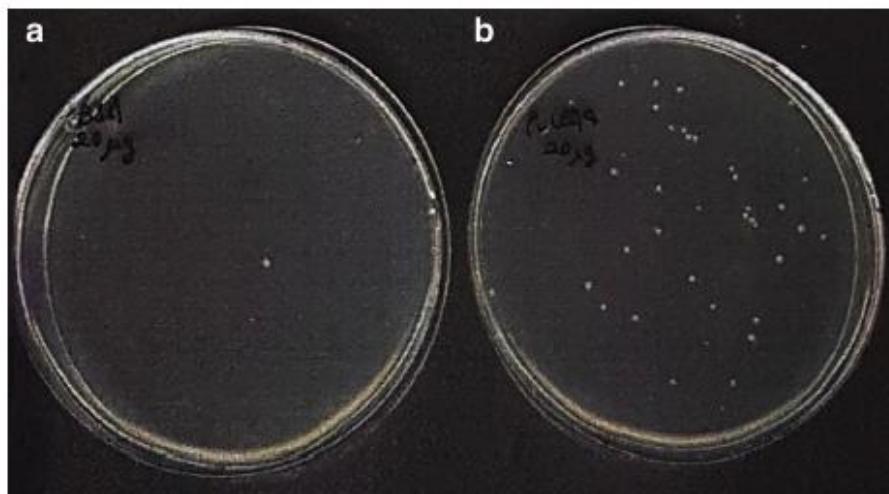


Рисунок 9 – Рост колоний *E. coli* при трансфекции плазмид, облучённых 1,25 Дж/см², в присутствии БСА (А) и LEA4 (В).

3.1.4. Заключение к разделу

Полученные результаты демонстрируют, что ангидробиотические личинки *Polypedilum vanderplanki* сохраняют жизнеспособность и репродуктивный потенциал после длительных экспозиций в условиях космического полёта, включая открытый космос, что указывает на сохранность онтогенетических программ и геномной стабильности при воздействии комплекса экстремальных факторов. При этом ключ к устойчивости, судя по нашим данным, заключается не в полном предотвращении повреждений, а в их переносимости с последующим высокоэффективным восстановлением: в ангидробиозе фиксируется фрагментация ДНК, однако после регидратации реализуется ускоренная репарация, причём кинетика ликвидации разрывов зависит от водного статуса и линейной плотности ионизации излучения (γ против высоко-LET частиц), к тому же «сухие» личинки демонстрируют большую радиоустойчивость, чем гидратированные. Результаты электронной микроскопии согласуются с этим механизмом, показывая конденсацию и сегрегацию хроматина и деформации ядерной оболочки в «сухом»

состоянии, что можно трактовать как физическую «консервацию» генома, снижающую экспонированность двойной спирали до момента возобновления процессов метаболизма.

Параллельно на транскриптомном и биохимическом уровнях выявлена предадаптация антиоксидантной системы (рост экспрессии *Sod*, *Cat*, *Gpx/Per* и суммарной антиоксидантной активности при переходе к анgidробиозу), уменьшая окислительный всплеск на ранних этапах регидратации.

В репарационных контурах доминируют раннее распознавание повреждений (*Rad23*) и активация гомологичной рекомбинации (*Rad51*), достигающей максимума вскоре после восстановления метаболизма, что подтверждает стратегию «перенести и восстановить». Такая логика согласуется с известной перекрёстной толерантностью десикации и радиации у бактериальных экстремофилов и сопоставима по фенотипу с тихоходками, хотя таксон-специфические различия в организации хроматина и составе белков-модификаторов остаются существенными.

Дополнением к ферментативной защите выступают белки анgidробиоза: показано, что PvLEA4 непосредственно стабилизирует ДНК *in vitro* и повышает устойчивость к УФ-повреждениям, что в совокупности с ядерной «упаковкой» и антиоксидантной предадаптацией формирует многокомпонентный барьер на этапах высушивания и регидратации. Интегративная модель, вытекающая из этих наблюдений, включает (1) структурную консервацию хроматина и ядерной архитектуры при дегидратации, (2) опережающую активацию антиоксидантного пула, (3) управляемую переносимость разрывов ДНК в «сухом» состоянии, (4) быструю HR-репарацию после регидратации и (5) физико-химическую экранировку макромолекул LEA-белками; именно эта комбинация позволяет *P. vanderplanki* выдерживать не отдельный стрессор, а их

экстремальную, в том числе и космическую комбинацию, сохраняя полный жизненный цикл.

3.2. Расшифровка генома *Polypedilum vanderplanki* и характеристики генома

3.2.1. Общие черты геномной организации *Polypedilum*

Для всестороннего понимания молекулярной природы ангидробиоза потребовалось выйти за пределы фрагментарных геномных данных и перейти к хромосомно организованному уровню. Сравнительный анализ геномов ангидробиотического вида *Polypedilum vanderplanki* и близкородственного десикационно-чувствительного *Polypedilum nubifer*, показал ряд характерных черт, задающих общий фон для эволюции ангидробиоза в этой группе. Прежде всего, у обоих видов выявлен небольшой размер генома, высокая доля аденина и тимина, а также заметно малое количество известного репетативного материала, включая транспозоны. Прогнозируемое числа белок-кодирующих локусов составило 17 137 для *P. vanderplanki* и 16 553 для *P. nubifer*, при этом полнота сборок подтвердилась покрытием «ядра» эукариотических генов (BUSCO/CEGMA). Уже на этом этапе была введена ключевая для дальнейшего анализа концепция - кластеры ангидробиоза (ARI_d, Anhydrobiosis-Related gene Island), представляющие собой участки генома, в которых сгруппированы гены, активируемые в процессе дегидратации/регистратации. К таким генным кластерам были отнесены, в частности, семейства LEA-белков, тиоредоксинов (TRX), гемоглобинов и L-изоаспартил-О-метилтрансфераз. Принципиально важно, что в геноме *P. nubifer* участки, удовлетворяющие критериям ARI_d, отсутствуют (Gusev et al., 2014; Petersen et al., 2023).

3.2.2. Хромосомная организация: кариотип, политетные карты и «особая роль» 4-й хромосомы

Последующее улучшение сборки *P. vanderplanki* до хромосомного уровня (Pv5.2) позволило перейти от контигов к четырём хромосомам и существенно углубить функциональную интерпретацию. Аннотированный геномный набор включает 18 989 генов и 65 981 транскриптов, при этом высокое качество аннотации подтверждено BUSCO (95,7% и 98,3%). Дополнительно, построенная карта контактов Hi-C не только поддерживает корректность сборки, но и позволяет локализовать теломерные участки. Визуализация на круговой диаграмме объединяет несколько ключевых параметров: расположение ARId-кластеров, вариабельность АТ-содержания, зоны различной генной плотности и блоки коллинеарности, что формирует целостное представление о крупномасштабной организации генома. (Рисунок 10) (Yoshida et al., 2022).

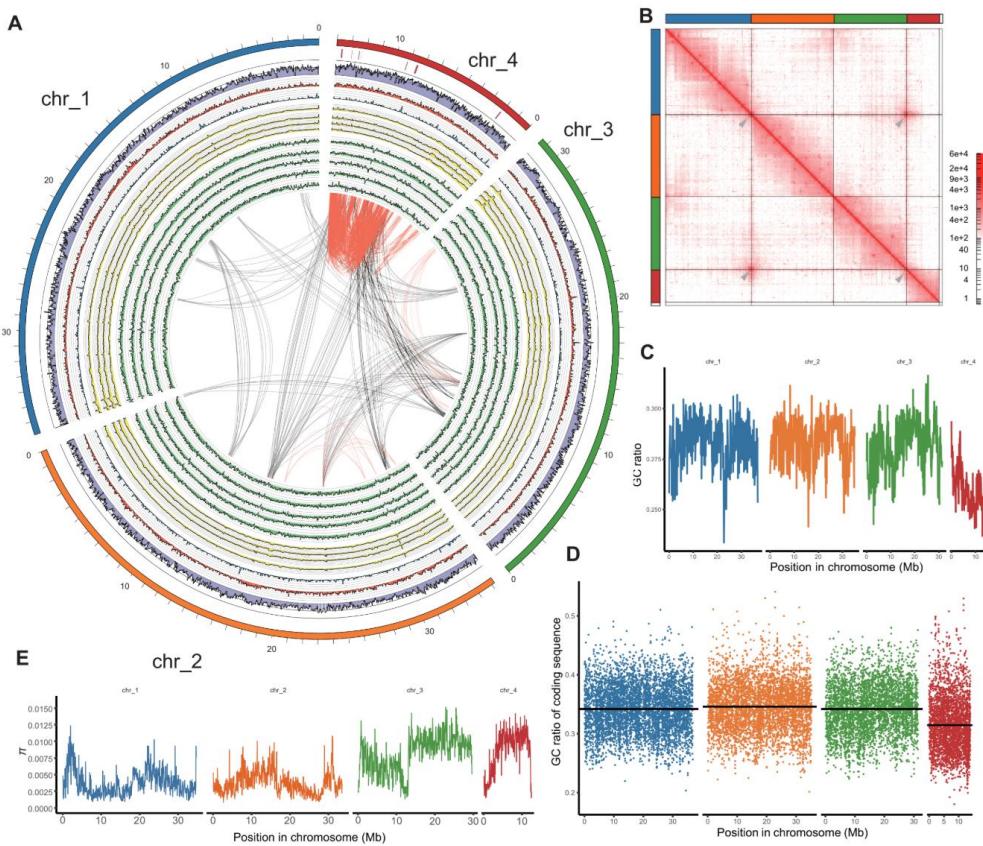


Рисунок 10 – Сборка генома *Polypedilum vanderplanki* в масштабе хромосомы. (А) Диаграмма Circos для четырёх хромосом. От внешней окружности к центру показаны: регионы ARId; доля AT% (фиолетовый); число генов в каждом окне по 50 кб (красный); число некодирующих генов в каждом окне по 50 кб (синий); покрытие генома чтениями Illumina DNA-seq (SRR12736661, SRR12736660, SRR12736662, SRR12736659 - жёлтый); покрытие RNA-seq (DRR024752, DRR024753, DRR024754, DRR024755, DRR024756 - зелёный); коллинеарные блоки, рассчитанные с помощью MCScanX (чёрный — межхромосомные, красный — внутрихромосомные). Цветовое кодирование хромосом сохраняется на последующих рисунках. (В) Контактная карта Hi-C. Чтения Hi-C выравнены на сборку генома, а контактные частоты, нормализованные методом KR, при разрешении 250 кб визуализированы как контактная карта (Juicer). Серые стрелки отмечают предполагаемые теломерные области. (С) Доля GC в окнах по 100 кб. (Д) Доля GC в кодирующих последовательностях (по длиннейшему изоформному транскрипту для каждого гена). Чёрные линии показывают средние значения по хромосомам (chr1: 34,20%; chr2: 34,60%; chr3: 34,17%; chr4: 31,50%). (Е) Парное нуклеотидное разнообразие (π) в окнах по 50 кб. Повышение π заметно во второй половине хромосомы 3 и на большей части хромосомы 4.

На фоне сформированной хромосомной карты особое внимание привлекла четвёртая хромосома (chr4), демонстрирующая ряд систематических отличий от остальных. Прежде всего, она характеризуется пониженным процентным содержанием нуклеотидов гуанина (G) и цитозина (C) в кодирующих последовательностях (31,5% против ~34% у chr1–chr3), а также повышенной нуклеотидной дивергенцией π по окнам 50 кб. Кроме того, именно на chr4 локализуется подавляющее большинство описанных ранее ARId: из девяти описанных островов семь приходятся на эту хромосому. Существенно и то, что chr4 обогащена видоспецифичными генами и демонстрирует признаки ускоренной молекулярной эволюции – по совокупности генов отмечено повышенное отношение скорости аминокислото-заменяющих (несинонимичных) замен к скорости синонимичных замен (dN/dS). Такой эволюционный профиль согласуется с концепцией «эволюционной песочницы» – специализированной области генома с ослабленными селективными ограничениями, где дупликации, перестройки и фиксация новых адаптивных вариантов происходят чаще. В результате chr4 становится фокусом накопления генов, обеспечивающих устойчивость к обезвоживанию и другим формам стрессового воздействия.

Дополнительную поддержку гипотезе о функциональной специализации chr4 даёт наблюдение за одним из её мультикопийных генетических кластеров. Так, крупное семейство генов, аннотированное как кодирующее ионотропные рецепторы, демонстрирует выраженную функциональную дивергенцию и признаки псевдогенизации. Несмотря на то, что chr4 действительно обогащена рядом классов транспозируемых элементов, результаты доменной разметки по базе Dfam показывают, что крупнейшая группа генов на этой хромосоме не связана с мобильными элементами. Это свидетельствует о том, что расширение семейства произошло не за счёт прямой мобилизации транспозонов. В совокупности, приведённые данные усиливают представление о chr4 как о геномной

области с пониженной структурной консервативностью, повышенной вариабельностью и направленной функциональной специализацией, ориентированной на обеспечение устойчивости к ангидробиозу.

Цитогенетические данные ограничено дополняют результаты геномного анализа, подтверждая особый статус chr4. У *P. vanderplanki* диплоидный набор равен 8 (Petrova et al., 2015), причем 4-я хромосома морфологически выделяется наличием крупных колец Бальбиани — маркеров усиленной транскрипции в политетенных хромосомах. Этот фенотипический признак хорошо согласуется с концентрацией на chr4 кластеров ARId и стресс-ассоциированных генов, поддерживая вывод о её функциональной специализации в адаптации к условиям ангидробиоза (Yoshida et al., 2022).

3.2.3. Паралогизация «защитных» генов, семейство PIMT и межвидовые различия

Ключевым примером направленной эволюции защитных генов является семейство PIMT (L-изоаспартил-О-метилтрансфераз) - S-аденозилметионин-зависимые ферменты, участвующие в восстановлении повреждённых белков, в частности за счет коррекции изоаспартила в полипептидных цепях. У ангидробионтов транскрипция генов этого семейства резко усиливается в фазах дегидратации и регидратации, что указывает на их роль в адаптации к циклам обезвоживания. Сравнительная геномика показала 14 паралогов PIMT у *P. vanderplanki* и 19 у *P. pembai*. Критическим отличием между видами стала судьба кластера PIMT4: у *P. pembai* выявлен блок из шести tandemных копий (PIMT4-1 - PIMT4-6) в том же геномном окружении, в котором у *P. vanderplanki* располагается одиночный PIMT4 (Cornette et al., 2017). В пределах этого расширенного участка (около 22,5–35 кб) у *P. pembai* детектирован след недавнего

положительного отбора с редукцией полиморфизма (selective sweep) по данным полногеномного пул-секвенирования. Тест Макдональда—Крайтмана для пар ортологов указывает на высокую долю фиксированных благоприятных замещений (среднее $\alpha \approx 0,69$) (Shaikhutdinov et al., 2023). Дополнительно, анализ отношения скорости аминокислото-заменяющих к синонимичным заменам в программе codeml выявляет статистически значимый сигнал положительного отбора именно в группе недавно дуплицированных копий PIMT4 (оценка $\approx 1,5$). В то же время, для остальной части семейства преобладает очистительный отбор. По экспрессии картина комплементарна: «родительская» копия PpPIMT4-1 (гомолог PvPIMT4) существенно усиливает транскрипцию на поздней стадии дегидратации (D48), тогда как новые дубликаты PpPIMT4-2, PpPIMT4-6 остаются умеренно активными; сходные пики наблюдаются и для другой «высокоиндуцируемой» пары Pv/PpPIMT12. Это, в свою очередь, слабо согласуется с чисто «дозозависимой» моделью (простого наращивания копий ради количества транскрипта) и лучше объясняется частичной нефункционализацией субклонов PIMT4 при сохранении «мастер-копии» как главного драйвера ответа. Показательно, что подобной амплификации не обнаружено для других «классических» защитных семейств из ARId — TRX, Hb, LEA — которые у *P. pembai*, напротив, представлены меньшим числом генов, чем у *P. vanderplanki*.

Таким образом, PIMT можно выделить как уникальный случай «точечной» паралогизации с признаками направленного отбора в линии *P. pembai*. Этот процесс, вероятно, отражает экологические условия южного Малави, где сухой сезон прерывается эпизодическими дождями, создавая ситуацию повторяющихся циклов «высыхание—регистрация» в пределах одного поколения. Подобный сценарий, по-видимому, формирует селективное давление, способствующее сохранению и функциональной диверсификации отдельных копий защитных генов. На уровне

межвидового сравнения дополнительно отмечается повышенная генетическая дифференциация на значительной части хромосомы 4 по сравнению с остальными хромосомами. В контексте уже известных данных о концентрации генов ангидробиоза на этой хромосоме это согласуется с её ролью как «узла» ускоренных адаптивных изменений.

3.2.4. Размер генома у хирономид, инtronная компактность

Мы обнаружили, что на уровне семейства Chironomidae закономерно наблюдаются «миниатюрные» геномы с узким диапазоном С-значений. Они варьируют от 0,07– до 0,20 пг ДНК, что эквивалентно приблизительно 68–195 Мб, и характерны как для *P. vanderplanki*, так и для *P. nubifer*. Таким образом, компактный геном представляет собой характерную черту хирономид в целом.

Полученные количественные оценки подтверждают, что именно малый размер генома формирует фон, благоприятный для дальнейших сравнительно-геномных анализов — в частности, для оценки вклада повторов и длины инtronов. Кроме того, такие данные позволяют проводить корректное сопоставление с геномными сборками у модельных видов рода *Polypedilum* (Cornette et al., 2015).

3.2.5. Митохондриальный геном: состав и возможные следы адаптации

Митохондриальный геном *P. vanderplanki* представляет особый интерес с точки зрения структуры и возможной функциональной адаптации. Его длина составляет 16 060 пар оснований при низком содержании гуанина и цитозина (20,6%). При этом геном включает 13 белок-кодирующих генов, 2 рРНК и 22 тРНК. Наиболее заметной особенностью является укороченная, богатая аденином и тимином

контрольная область в сочетании с избыточностью межгенных спейсеров – всего 29 участков длиной 1–171 п. н. Представляется вероятным, что такая архитектура связана с регулярной полной дегидратацией личинок и особенностями поддержания/восстановления митохондриальной организации при циклах “высыхание—регистрация” (Deviatiiarov et al., 2017).

3.2.6. Заключение к разделу

В совокупности представленные данные позволяют выделить несколько взаимодополняющих уровней геномной адаптации к ангиобиозу. На фоне семейно-специфичных признаков, таких как малый размер генома, укороченные интроны и низкая представленность транспозируемых элементов, формируется компактная архитектура, способствующая высокой скорости развития и адаптации к биотопам с неустойчивым доступом к воде. На этом фоне у *P. vanderplanki* возникает хромосомно организованная специализация — хромосома 4 с пониженной долей гуанина и цитозина, повышенной вариабельностью, накоплением ARId и концентрации быстро эволюционирующих, часто видоспецифичных генов. В пределах таких участков высокой пластичности возникают направленные дупликации отдельных защитных генов — как это показано на примере кластера PIMT4 у *P. retbai*, демонстрирующего tandemную амплификацию, сигнатуры недавнего положительного отбора и сохранение функционально активной «якорной» копии. Наконец, митохондриальный геном *P. vanderplanki* при типичном наборе белок-кодирующих и РНК-генов показывает необычную организацию (короткая богатая аденином и тимином контрольная область и множество межгенных спейсеров), что может отражать специфику ангиобиоза. В совокупности данные от первых сравнительных сборок до хромосомного референса и

популяционной геномики указывают, что у *Polypedilum* ангидробиоз опирается на (а) филогенетически обусловленную «минималистскую» архитектуру генома, (б) специализацию целой хромосомы как площадки ускоренной эволюции и (в) точечные, но функционально значимые амплификации «защитных» генов в пределах ARId, сопровождаемые положительным отбором и регуляторной переразметкой; тем самым ключ к экстремальной устойчивости лежит не в одном «супергене», а в пространственно организованных наборах генов и их копий, эволюционировавших в условиях повторяющихся циклов обезвоживания и регидратации.

3.3. Кластеризация и амплификация генов как элемент адаптации к ангидробиозу

3.3.1. Геномные кластеры и архитектура ангидробиоз-ассоциированных генов у *Polypedilum*

Геномный анализ *Polypedilum vanderplanki* выявил наличие компактных кластеров генов, ассоциированных с ангидробиозом — так называемых anhydrobiosis-related islands (ARIds). Эти участки характеризуются высокой плотностью паралогов, вовлечённых в молекулярные механизмы устойчивости к обезвоживанию. ARId-кластеры представляют собой видоспецифический признак, уникальный для *P. vanderplanki*, и полностью отсутствуют у близкородственного вида *P. nubifer*, геном которого содержит лишь одиночные копии соответствующих генов (например, единственный *Pim1*) и не демонстрирует аналогичной кластерной организации (Deviatiiarov et al., 2020).

В ARIds *P. vanderplanki* отмечается активная транскрипционная реакция на дегидратацию: множество входящих в состав кластеров генов

демонстрируют резкое повышение уровня экспрессии. Особенно показательной является организация семейства *PvLea*: из 27 идентифицированных генов 26 локализованы в двух кластерах — ARId1 и ARId2. В условиях дегидратации экспрессия 23 из них возрастает более чем в три раза, что подчёркивает их ключевую роль в реализации ангидробиотического фенотипа. Геномная топология ARId-кластеров представлена на карте (Рисунок 11) (Voronina et al., 2020; Hatanaka et al., 2015).

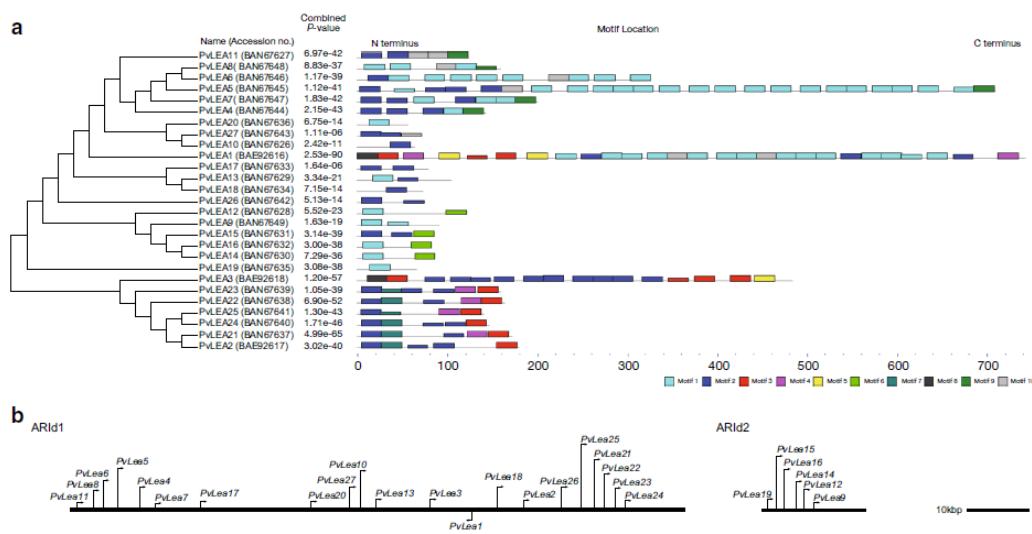


Рисунок 11 – Дупликации генов PvLea и их взаимосвязи. а — анализ аминокислотных последовательностей белков LEA у *P. vanderplanki*, выполненный на основе предсказанных аминокислотных последовательностей и распределения мотивов в каждом белке PvLEA. Высота блока мотива пропорциональна значению Р. Значение Р отражает наилучшее соответствие последовательности группе мотивов. Филогенетическое дерево построено методом соседних объединений (neighbor-joining) в программе MEGA 6. Для проверки достоверности использован бутстрэп-метод с 1000 репликами. Распределение мотивов определено с помощью анализа MEME (версия 4.9.1). Параметры MEME: любое число повторений при распределении мотивов; минимальная и максимальная длина мотивов — 22. б — расположение генов PvLea в геноме *P. vanderplanki*. Гены PvLea сгруппированы в компактные кластеры (ARId — anhydrobiosis-related gene island). ARId1 включает 21 ген PvLea,

ARIId2 — 6 генов PvLea. Стрелками показана ориентация открытых рамок считываивания для каждого PvLea. Масштабная линейка — 10 тыс. пар нуклеотидов (10 kbp).

Особое место в архитектуре кластера ARIId1 занимает чередование блоков генов *PvLea* с представителями новой группы, обозначенной как *PvLil* (*LEA-Island Located*). Гены *PvLil* были впервые идентифицированы как тандемно расположенные элементы, локализованные между копиями *PvLea*, формируя с ними единую физическую цепь. Филогенетический анализ показал сближение *PvLil* с подсемейством *PvLea1/3*, что указывает на возможное функциональное и эволюционное родство между этими группами. Схематическое представление соответствующего фрагмента ARIid1 (нуклеотидная позиция 27 300–98 100) иллюстрирует пространственное расположение генов: *PvLea* (жёлтым) и *PvLil* (синим), и служит ключевой визуальной опорой для анализа кластерной организации данного участка (Рисунок 12).

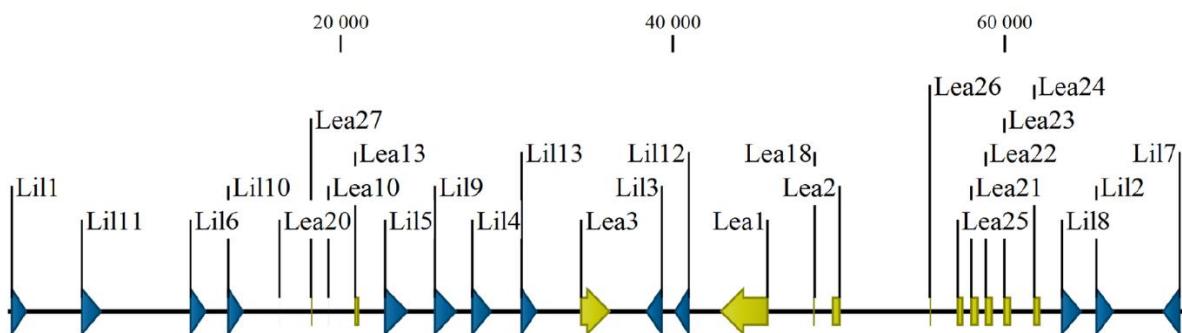


Рисунок 12 – Локализация генов PvLea и PvLil в ARIid1. Схематическое изображение участка региона ARIid1 (нуклеотиды 27 300–98 100), включающего все гены PvLil. Гены показаны стрелками и прямоугольниками; цвет обозначает тип генов: PvLil (синий) и PvLea (жёлтый).

В пределах каждого субкластера *PvLea* гены организованы в тандемные массивы: (*PvLea11*, *PvLea8*, *PvLea6*, *PvLea5*, *PvLea4*, *PvLea7*), (*PvLea20*, *PvLea27*, *PvLea10*), (*PvLea15*, *PvLea16*, *PvLea14*, *PvLea12*,

PvLea9), (*PvLea25*, *PvLea21*, *PvLea22*, *PvLea23*, *PvLea24*). Гены внутри каждого тандемного блока демонстрируют более высокую степень последовательностного сходства между собой, чем по отношению к генам из других массивов, что согласуется с гипотезой их происхождения путём локальных дупликаций.

Результаты мотивного анализа подтверждают эту филогенетическую близость: члены отдельных подгрупп имеют сходные комбинации повторяющихся 11-мерных последовательностей (например, варианты *AKDXTKEKAXE*, обозначенные как «motif 1/2»). При этом вариабельность числа и локализации этих мотивов может отражать функциональную дивергенцию между копиями.

В совокупности, архитектура ARId-клластеров у *P. vanderplanki* представляет собой эволюционно сформированные модули, в которых сочетаются тандемные дупликации и физическая ко-локализация функционально комплементарных семейств — гидрофильных *LEA* и трансмембранных *LIL*. Такое устройство обеспечивает согласованную регуляцию транскрипции в ключевые временные окна (что подтверждено для большинства *PvLea*), а также пространственную интеграцию белков с различными биофизическими свойствами в пределах одного геномного блока (Voronina et al., 2020).

Для сопоставления принципиально важно отметить отсутствие ARId-клластеров у *P. nubifer*, что подчёркивает значение этой организации как потенциальной «геномной подписи» ангидробиоза у африканских хирономид (Deviatiiarov et al., 2020).

Не менее показательной является организация семейства *PIMT* (*L-isooaspartate O-methyltransferases*). В то время как у большинства животных ген *Pimt* представлен в единственном экземпляре, у *Polypedilum vanderplanki* было идентифицировано 15 паралогов, локализованных в

пределах ARId-кластеров. Эти участки генома демонстрируют выраженную транскрипционную активность в ответ на дегидратацию, при этом паралогические копии *Pimt* распределены между несколькими кластерами ко-экспрессии, что указывает на их возможную функциональную специализацию (Рисунок 13) (Deviatiiarov et al., 2020).

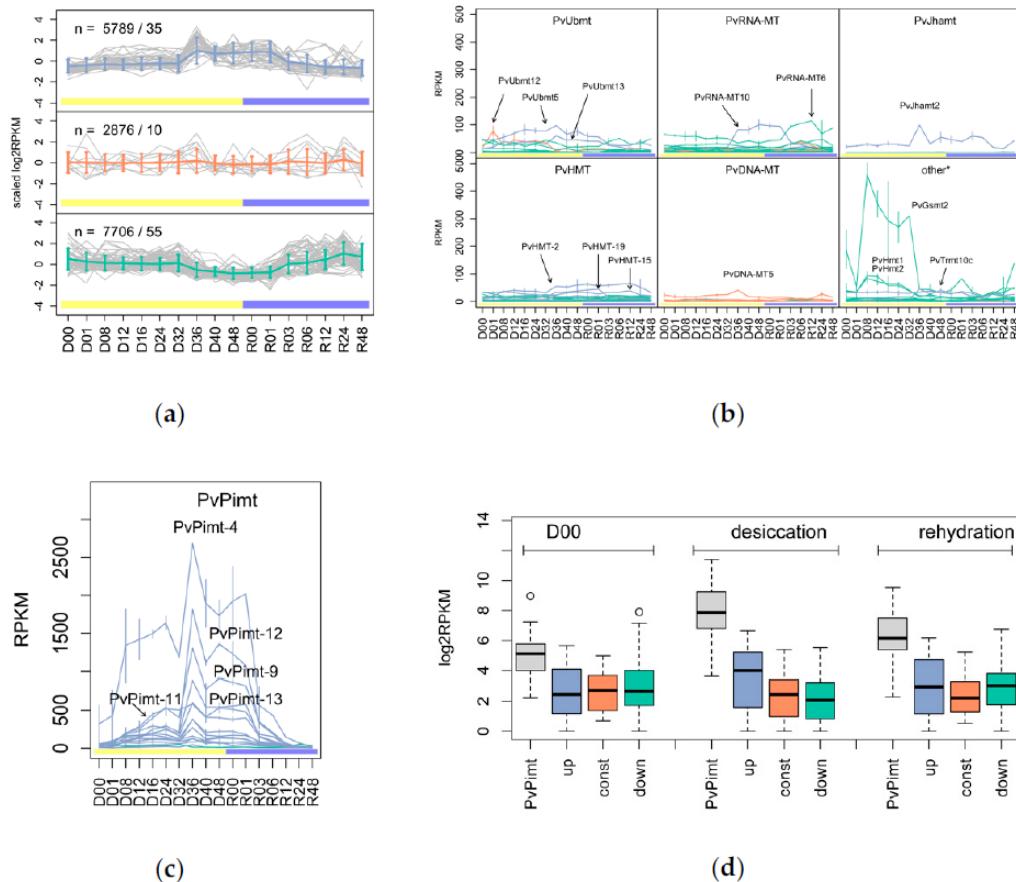


Рисунок 13 – Профили экспрессии SAM-зависимых метилтрансфераз у личинок *Polypodium vanderplanki* в условиях дегидратации (жёлтый) и регидратации (синий). А) Кластеризация метилтрансфераз методом самоорганизующихся карт (*Self-Organizing Maps*, SOM), позволившая выделить три группы по характеру транскрипционного ответа: с повышением экспрессии (синий), стабильной экспрессией (красный) и снижением экспрессии (бирюзовый); *n* — число генов/общее количество метилтрансфераз в каждой группе. В, С) Сводный обзор уровней экспрессии различных типов метилтрансфераз в рамках обозначенных групп. Д) Динамика экспрессии генов *PvPimt* в сопоставлении с другими представителями выявленных кластеров ко-экспрессии. Обозначения

временных точек: D00 — контроль; D01–D48 — стадии дегидратации (1–48 ч, жёлтая зона); R00–R48 — стадии регидратации (0–48 ч, синяя зона).

Межвидовой сравнительный анализ выявил направленную перестройку локуса *PIMT* у *Polypedilum pembai* по сравнению с *P. vanderplanki*, основным элементом которой стала амплификация подсемейства *PIMT4*. Тогда как у *P. vanderplanki* в геноме присутствует лишь одиночная копия *PvPIMT4*, у *P. pembai* на этом же участке был идентифицирован тандем из шести паралогов — *PpPIMT4-1*, *PpPIMT4-6*. При этом порядок генов и соседние маркеры сохраняют синтению: тандемная амплификация произошла в том же геномном контексте, что и исходный *PvPIMT4* (Рисунок 14) (Shaikhutdinov et al., 2023).

Удлинение соответствующего локуса с ~60 кб у *P. vanderplanki* до ~85 кб у *P. pembai* полностью объясняется вставкой дополнительных копий *PIMT4*. Равномерное покрытие секвенирующими ридами по всей протяжённости региона у обоих видов исключает вероятность сборочных артефактов (Рисунок 14). Дополнительные данные популяционного секвенирования показали, что в геноме *P. pembai* участок с новыми копиями характеризуется сниженным уровнем нуклеотидного разнообразия по сравнению с окружающими регионами. В то же время ортологичный участок у *P. vanderplanki* таких признаков не демонстрирует. Этот контраст интерпретируется как следствие недавнего селективного «сканирования» в популяции *P. pembai* (Shaikhutdinov et al., 2023).

Результаты транскриптомного анализа подтверждают функциональную релевантность амплификации: все 19 паралогов *PIMT*, выявленных у *P. pembai*, дифференциально экспрессируются в ответ на обезвоживание. Максимальная транскрипционная активность наблюдается у «якорной» копии *PpPIMT4-1*, достигающей пика на 48-м часу дегидратации (D48), тогда как другие члены тандемного блока (*PpPIMT4-2*, *PpPIMT4-6*) демонстрируют умеренное, но стабильное повышение

экспрессии (Рисунок 15). В то же время общий характер экспрессии генов семейства *PIMT* у обоих видов остаётся в целом консервативным.

Примечательно, что аналогичных амплификаций в других ключевых семействах, локализованных в ARId (например, *LEA*, *TRX*, *Hb*), у *P. pembai* не обнаружено. Более того, в ряде случаев наблюдается даже сокращение числа генов по сравнению с *P. vanderplanki*, что подчёркивает специфичность амплификации именно в локусе *PIMT* (Рисунок 14) (Shaikhutdinov et al., 2023).

В совокупности представленные данные — сохранение синтезии, равномерное покрытие секвенированием, изменения в нуклеотидном полиморфизме и различия в транскрипционной активности — согласуются с гипотезой о недавней адаптивной амплификации *PIMT4* у *P. pembai*. Эта перестройка, вероятно, представляет собой ответ на более частые циклы дегидратации/регидратации, характерные для экосистем Малави, с последующей частичной суб- и неофункционализацией отдельных дубликатов. Дополнительным аргументом в пользу функциональной дивергенции в семействе служит наблюдение, что у *P. vanderplanki* каталитическую активность в стандартных условиях демонстрируют только *PIMT1* и *PIMT2*, тогда как большинство других паралогов утратили «каноническую» функцию SAM-зависимых метилтрансфераз, о чём свидетельствуют данные по ферментативной активности и кристаллографическим структурам (Shaikhutdinov et al., 2023; Deviatiiarov et al., 2020).

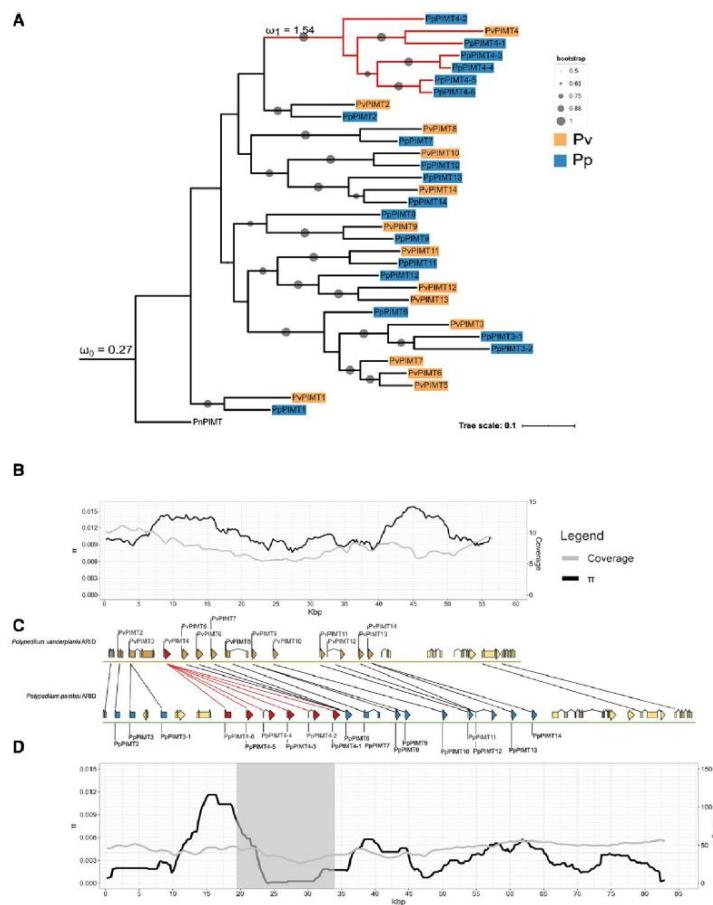


Рисунок 14 – Сравнительный анализ локуса PIMT ARId у двух видов хирономид. А) Филогенетическое дерево, построенное методом Maximum Likelihood (ML) с бутстрэп-тестированием (100 реплик). Pv — *P. vanderplanki*; Pp — *P. pembai*; Pn — *P. nubifer*. Красным выделена филогенетическая ветвь под действием положительного отбора; синим — гены PIMT *P. pembai*; оранжевым — гены PIMT *P. vanderplanki*. В) «Уровень нуклеотидного полиморфизма вдоль локуса PIMT ARId у *P. vanderplanki*. С) Сравнение порядка генов в двух ARId. Чёрные линии показывают гомологичные гены. Д) Нуклеотидный полиморфизм вдоль локуса PIMT ARId у *P. pembai*. Серым цветом обозначена зона селективной «зачистки», выявленная методом Pool-hmm. Кривые покрытия, показанные на А, Д), построены на основе картирования популяционных данных: популяция Tashan nabai для *P. vanderplanki* и популяция Chikora для *P. pembai*. ω_1 обозначает отношение несинонимичных к синонимичным заменам (dN/dS) для «переднего плана» (foreground), а ω_0 — для «фона» (background).

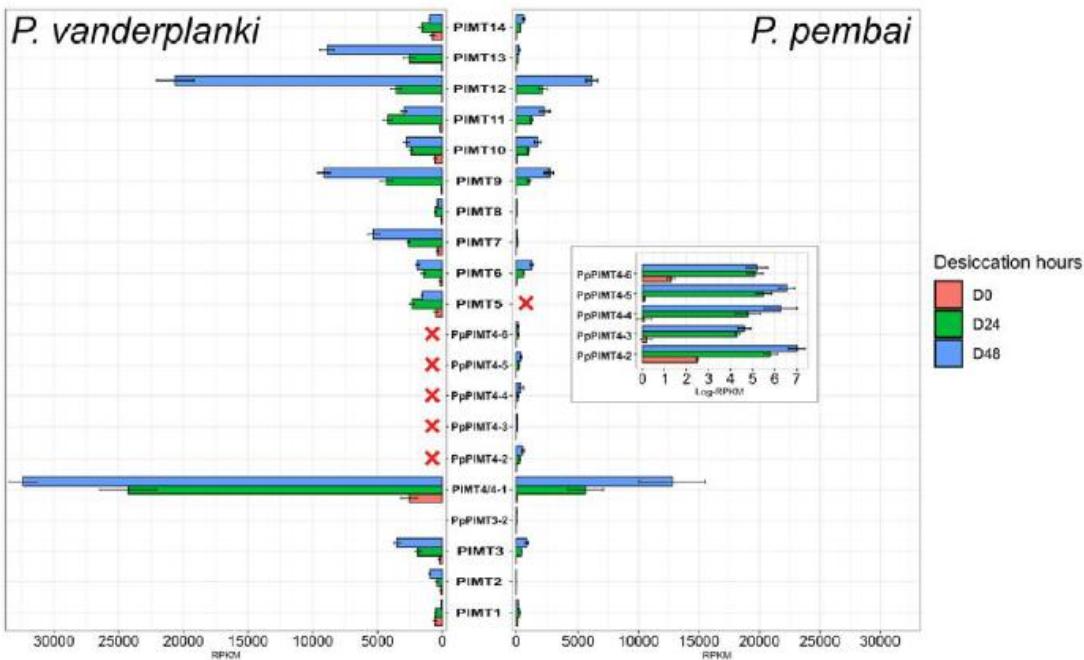


Рисунок 15. Дифференциальная экспрессия генов PIMT у *P. vanderplanki* и *P. pembai* в ответ на обезвоживание. Профили экспрессии 14 генов PvPIMT (левая панель) и 19 генов PpPIMT (правая панель) в ходе дегидратации. На вставке в правой панели показана экспрессия дуплицированных паралогов в логарифмическом масштабе. Красными крестами обозначены паралоги, отсутствующие в соответствующем геноме. D0 — контроль; D24, D48 — дегидратация в течение 24 и 48 ч, соответственно. Pv — *P. vanderplanki*; Pp — *P. pembai*.

3.3.2. Паралогическое разнообразие и экспрессия LEA-белков

В геноме *Polypedilum vanderplanki* идентифицировано 27 генов, относящихся к семейству *PvLea*, все из которых классифицируются как представители группы 3 LEA-белков. Для характеристики внутрисемейных взаимоотношений между паралогами был проведён анализ предсказанных аминокислотных последовательностей, включая оценку мотивной организации (Hatanaka et al., 2015).

Филогенетическая реконструкция позволила выделить несколько подгрупп, в пределах которых «сестринские» копии демонстрируют

наибольшее структурное сходство. Анализ распределения повторяющихся участков показал соответствие классическому 11-мерному мотиву *LEA_4* (PF02987). При этом число *LEA_4*-мотивов варьирует в широких пределах: от 0–2 у коротких белков до 6–14 у наиболее протяжённых представителей. Такая вариативность указывает на значительную структурную диверсификацию внутри семейства и потенциальные различия в биофизических свойствах кодируемых белков (таблица 1) (Hatanaka et al., 2015).

Таблица 1 – Характеристики LEA белков у *P. vanderplanki*.

Name	ID	Len ^a	MW ^b	pI ^c	GRAVY ^d	Fold index ^e	Loc (PSORT) ^f	Loc (confirmed) ^g	LEA_4 ^h
<i>PvLea1</i>	AB207255	742	83.3	8.17	-0.643	0.037	Cell membrane	Cell membrane	13
<i>PvLea2</i>	AB207256	180	20.7	6.39	-1.263	0.155	Cytosol	Cytosol and nuclear	2
<i>PvLea3</i>	AB207257	484	54.5	5.53	-0.34	0.118	Cell membrane	Possibly ER	0
<i>PvLea4</i>	AB841344	143	16.2	5.4	-1.487	-0.24	Nuclear	Cytosol and nuclear	4
<i>PvLea5</i>	AB841345	709	78.4	5.41	-1.082	-0.113	Cytosol	Cytosol	14
<i>PvLea6</i>	AB841346	325	35.8	4.8	-1.189	-0.185	Cytosol	Cytosol	9
<i>PvLea7</i>	AB841347	200	22.6	4.96	-1.328	-0.024	Nuclear	Cytosol	6
<i>PvLea8</i>	AB841348	159	17.1	4.44	-0.77	-0.085	Cytosol	Cytosol and nuclear	4
<i>PvLea9</i>	AB841349	91	10.5	4.8	-1.373	-0.282	Cytosol	Cytosol and nuclear	2
<i>PvLea10</i>	AB841326	63	6.9	8.86	-1.224	-0.169	Nuclear	Cytosol and nuclear	2
<i>PvLea11</i>	AB841327	124	13.1	4.74	-0.681	-0.018	Cytosol	Cytosol and nuclear	1
<i>PvLea12</i>	AB841328	120	13.8	4.36	-0.923	-0.194	Cytosol	Cytosol and nuclear	1
<i>PvLea13</i>	AB841329	104	12.0	4.43	-0.928	-0.171	Cytosol	Cytosol and nuclear	1
<i>PvLea14</i>	AB841330	85	9.7	5.45	-1.048	-0.106	Cytosol	Cytosol and nuclear	1
<i>PvLea15</i>	AB841331	84	9.4	5.17	-0.964	-0.093	Cytosol	Cytosol and nuclear	1
<i>PvLea16</i>	AB841332	81	9.2	4.59	-1.019	-0.16	Cytosol	Cytosol and nuclear	1
<i>PvLea17</i>	AB841333	79	9.2	5.95	-1.239	-0.036	Nuclear	Cytosol and nuclear	1
<i>PvLea18</i>	AB841334	73	8.2	6.29	-0.797	-0.005	Nuclear	Cytosol and nuclear	1
<i>PvLea19</i>	AB841335	66	7.5	4.89	-0.548	0.011	Cytosol	Cytosol and nuclear	1
<i>PvLea20</i>	AB841336	56	6.4	7.88	-1.704	-0.304	Nuclear	Cytosol and nuclear	1
<i>PvLea21</i>	AB841337	172	19.1	7.72	-0.771	-0.003	Cytosol	Cytosol and nuclear	0
<i>PvLea22</i>	AB841338	164	18.7	7.71	-0.795	-0.01	Cytosol	Cytosol and nuclear	0
<i>PvLea23</i>	AB841339	160	18.2	5.88	-0.96	-0.068	Cytosol	Cytosol and nuclear	0
<i>PvLea24</i>	AB841340	147	16.4	9.04	-0.684	0.003	Cytosol	Cytosol and nuclear	0
<i>PvLea25</i>	AB841341	141	16.1	7.78	-1.057	-0.093	Cytosol	Cytosol and nuclear	0
<i>PvLea26</i>	AB841342	73	8.0	5.6	-0.807	-0.036	Cytosol	Cytosol and nuclear	0
<i>PvLea27</i>	AB841343	70	7.5	7.87	-0.747	-0.004	Cytosol	Cytosol and nuclear	0

Профили экспрессии генов *PvLea* у личинок *Polypedilum vanderplanki* демонстрируют чётко выраженную стадийную динамику в течение цикла дегидратации и последующей регидратации. Для большинства паралогов зафиксирована транскрипционная индукция на одном или нескольких этапах, включая как раннюю, так и позднюю фазы обезвоживания, а также

фазу восстановления водного баланса. Такая пятерная активность согласуется с гипотезой о функциональной специализации отдельных генов по временным «окнам» ангиробиоза (Hatanaka et al., 2015).

Эксперименты на клеточной линии *Pv11* воспроизводят общие закономерности, наблюдаемые *in vivo*. За исключением *PvLea16* и *PvLea17*, экспрессия остальных генов семейства регистрируется в клеточной модели. Большинство из них демонстрирует статистически значимую индукцию в рамках стандартного протокола: предварительная обработка трегалозой (24/48 ч) → дегидратация → регидратация. У значительного числа паралогов максимальные уровни транскрипции приходятся на 24-й час индукции (Kondratyeva et al., 2022).

Корреляционный анализ показал высокую степень согласованности ранговых уровней экспрессии между *Pv11* и личинками на сопоставимых временных точках. В то же время, выявлены и частные различия: например, *PvLea4* в *Pv11* экспрессируется на заметно более низком уровне, тогда как *PvLea7*, *PvLea10*, *PvLea20* и *PvLea27* в контрольных условиях демонстрируют повышенную транскрипционную активность по сравнению с личинками (Рисунок 16) (Kondratyeva et al., 2022).

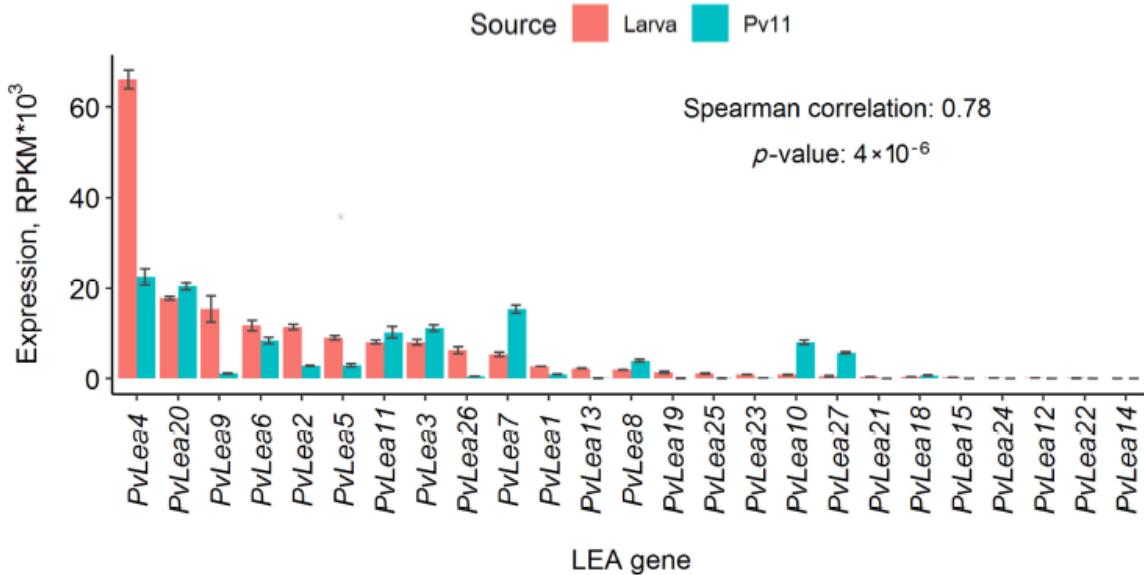


Рисунок 16 – Экспрессия генов PvLea у личинок *P. vanderplanki* и в клетках Pv11 через 24 ч после индукции ангидробиоза. Уровни экспрессии представлены в единицах RPKM (число ридов на килобазу экзона на миллион картированных ридов). Высота столбцов соответствует среднему значению по биологическим повторам, вертикальные линии отражают стандартное отклонение. Красным цветом показаны данные для личинок, сине-зелёным — для клеток Pv11. Гены расположены в порядке убывания экспрессии в личинках, идентификаторы указаны под диаграммой. В тексте диаграммы приведены значения коэффициента корреляции Спирмена между средними уровнями экспрессии в Pv11 и у личинок, а также соответствующее р-значение.

Дополнительно выявлена ассоциация между числом LEA_4-мотивов в аминокислотной последовательности и уровнем транскрипции соответствующих генов в ряде экспериментальных условий — контроль, 48 часов после обработки трегалозой и 24 часа после регидратации. В целом, паралоги с большим количеством 11-мерных повторов, как правило, демонстрируют более высокие уровни экспрессии (Kondratyeva et al., 2022). Данная корреляция поддерживает гипотезу о существовании согласованности между «структурным кодом» LEA-белков и их транскриptionальным ответом на стрессовые воздействия. Это указывает на

возможную коэволюцию структурных и регуляторных характеристик в рамках функциональной специализации отдельных паралогов (рисунок 17).

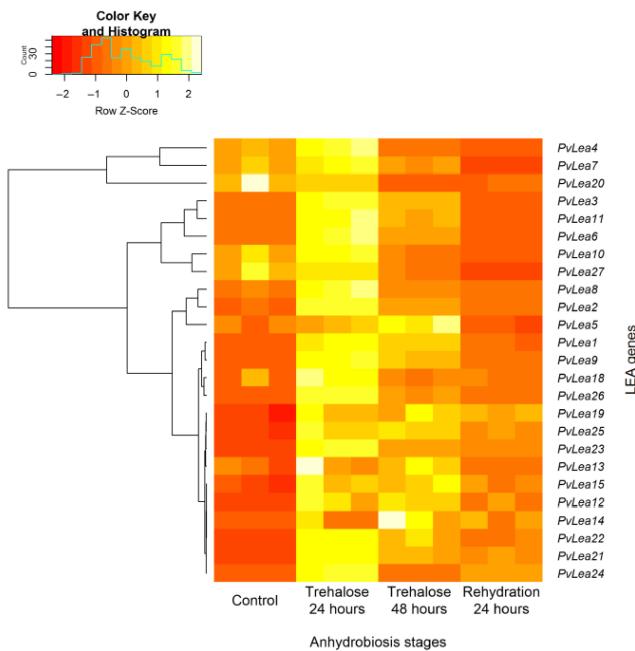


Рисунок 17 – Тепловая карта экспрессии генов PvLea в клетках Pv11 в контрольных условиях и на различных стадиях индукции ангидробиоза (обработка трегалозой). Экспериментальные условия обозначены внизу схемы. Нормализованные значения экспрессии (RPKM) пересчитаны отдельно для каждого гена, строки соответствуют отдельным генам, их названия приведены справа. Цветовая шкала в верхней части рисунка отражает относительный уровень экспрессии: от минимальных (тёмные оттенки) до максимальных (светлые оттенки). Слева скобками показаны кластеры, выделенные на основе сходства профилей относительной экспрессии.

3.3.3. Новая группа трансмембранных генов LIL и их связь с LEA-кластером

В составе кластера ARId1 у *Polypedilum vanderplanki* идентифицирована ранее не описанная группа генов, обозначенная как LIL (*LEA-Island Located*), тандемно встроенная между блоками *PvLea*. Эти гены филогенетически сближаются с подсемейством *PvLea1/3*, однако резко отличаются от классических LEA-белков по своей биофизической

характеристике и доменной архитектуре. Всего было идентифицировано 13 генов *PvLil* (*PvLIL1–PvLIL13*), формирующих компактный кластер, специфичный для *P. vanderplanki* и отсутствующий у близкородственного *P. nubifer*.

Сравнительный биоинформатический анализ (инструменты ProtParam и FoldIndex) показал, что белки *PvLIL* обладают высокой степенью гидрофобности и, в отличие от LEA-белков, находятся преимущественно в свёрнутом состоянии. Расчётные молекулярные массы варьируют от ~25,9 до 33,8 кДа, значения GRAVY (Grand Average of Hydropathicity) — положительные (приблизительно от 0,13 до 0,87), что указывает на доминирование гидрофобных остатков. Индекс свёрнутости (*FoldIndex*) также положительный ($\approx 0,27\text{--}0,50$), что свидетельствует об отсутствии глобальной неупорядоченности, характерной для типичных LEA-белков. Изоэлектрические точки лежат в широком диапазоне — от ~4,87 до 9,14, что отражает потенциальное функциональное разнообразие (Voronina et al., 2020). Сводные характеристики аминокислотных последовательностей *PvLIL* представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Свойства аминокислотных последовательностей белков PvLIL. Данные о молекулярной массе, теоретической изоэлектрической точке (pI) и среднем показателе гидропатии (GRAVY) получены на основе анализа аминокислотных последовательностей белков, соответствующих генам PvLil, с использованием инструмента ProtParam. Значения индекса свёрнутости (FoldIndex) рассчитаны с помощью сервиса FoldIndex (15955783).

Protein	GenBank accession number	Length	Mass, kDa	GRAVY index	Fold index	pI
PvLIL1	MT043332	252	29.2	0.34	0.34	8.47
PvLIL2	MT043333	245	28.3	0.32	0.33	8.40
PvLIL3	MT043334	229	25.9	0.87	0.50	5.41
PvLIL4	MT043335	232	27.1	0.62	0.42	5.94
PvLIL5	MT043336	284	32.9	0.13	0.27	8.02
PvLIL6	MT043337	242	27.8	0.51	0.39	6.19
PvLIL7	MT043338	233	26.87	0.78	0.46	5.20
PvLIL8	MT043339	232	26.6	0.44	0.35	9.18
PvLIL9	MT043340	237	27.2	0.38	0.34	8.97
PvLIL10	MT043341	239	27.7	0.53	0.40	7.70
PvLIL11	MT043342	296	33.8	0.2	0.29	5.90
PvLIL12	MT043343	256	29.2	0.62	0.41	4.87
PvLIL13	MT043344	230	26.3	0.41	0.33	9.14

Для всех белков *PvLIL* предсказано наличие четырёх–пяти трансмембранных доменов, что подтверждено с использованием алгоритмов *Phobius* и *TMpred*. Типовая топология молекулы проиллюстрирована на примере *PvLIL10* (Рисунок 18). Экспериментальные данные подтверждают мембранный локализацию по крайней мере трёх представителей семейства — *PvLIL1*, *PvLIL2* и *PvLIL10*: гибридные конструкции *PvLIL-AcGFP*, экспрессированные в клеточной линии *Pv11*, демонстрируют чёткую локализацию сигнала в плазматической мемbrane.

Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей выявило 15 полностью консервативных позиций, большинство из которых сосредоточены внутри трансмембранных спиралей или в их непосредственной близости. Специфические для

семейства *LIL* мотивы преимущественно располагаются на границах ТМ-сегментов и не встречаются в предполагаемых внеклеточных петлях. Первый внеклеточный участок, напротив, является наиболее вариабельным по составу, однако содержит две консервативные цистеиновые остатки, потенциально способные к формированию дисульфидной связи (Рисунок 19).

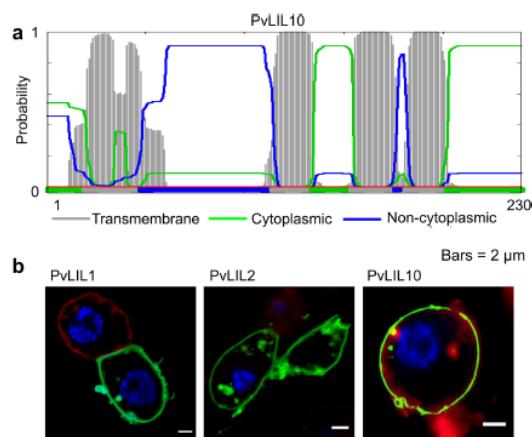


Рисунок 18 – А) Типовая схема трансмембранный топологии белков PvLIL; Б) локализация химер PvLIL–AcGFP в плазматической мембране клеток Pv11.

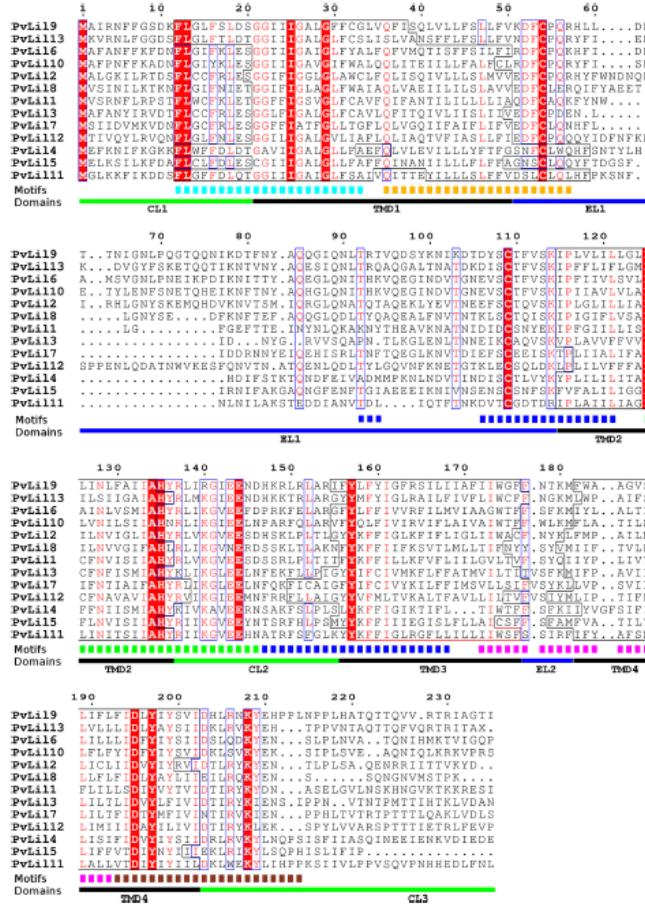


Рисунок 19 – Распределение доменов и мотивов в последовательностях PvLIL. Красным фоном и красными буквами на выравнивании обозначены аминокислотные остатки с 100%-ной и $\geq 70\%$ -ной консервативностью, соответственно. Цветные штриховые и сплошные линии под выравниванием показывают PvLIL-специфические мотивы, идентифицированные с помощью MEME. Сплошные линии под выравниванием обозначают позиции доменов, предсказанных программой TMpred: чёрные линии — трансмембранные домены (TMD), зелёные линии — цитоплазматические петли (CL), синие линии — внеклеточные петли (EL). Точные позиции предсказанных трансмембранных доменов в каждом белке отмечены тонкой чёрной линией.

Классический 11-мерный мотив *LEA_4* (PF02987), определяющий принадлежность белков к группе 3 LEA, практически отсутствует в аминокислотных последовательностях белков семейства *PvLIL*.

Единственным частным исключением является *PvLIL12*, в котором выявлены отдельные *LEA*-подобные участки. Результаты множественного выравнивания и мотивного анализа показывают, что сходство между *PvLIL* и *PvLEA* ограничено не-*LEA*-сегментами, представленными у *PvLEA1* и *PvLEA3*. Именно в этих областях выявлены предсказанные трансмембранные сегменты, демонстрирующие общность происхождения с доменами *LIL*-типа. При этом «*LEA*-ядро», представленное повторяющимися 11-мерными мотивами, у *PvLIL* полностью отсутствует (Voronina et al., 2020).

На основании этих данных *PvLEA1* и *PvLEA3* рассматриваются как химерные белки, сочетающие участки, характерные для классических растворимых *LEA*-белков, и трансмембранные домены, типичные для *PvLIL* (Рисунок 20). Это наблюдение коррелирует с экспериментально установленной локализацией: *PvLEA1* преимущественно ассоциирован с плазматической мембраной, тогда как *PvLEA3* локализуется в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи. Таким образом, наблюдается функциональный и структурный мост между растворимым *LEA*-контуром и мембранны-связанным *LIL*-контуром, прослеживаемый как на уровне геномной архитектуры, так и на уровне клеточной локализации белков (Рисунок 21) (Voronina et al., 2020; Hatanaka et al., 2015; Kondratyeva et al., 2022).

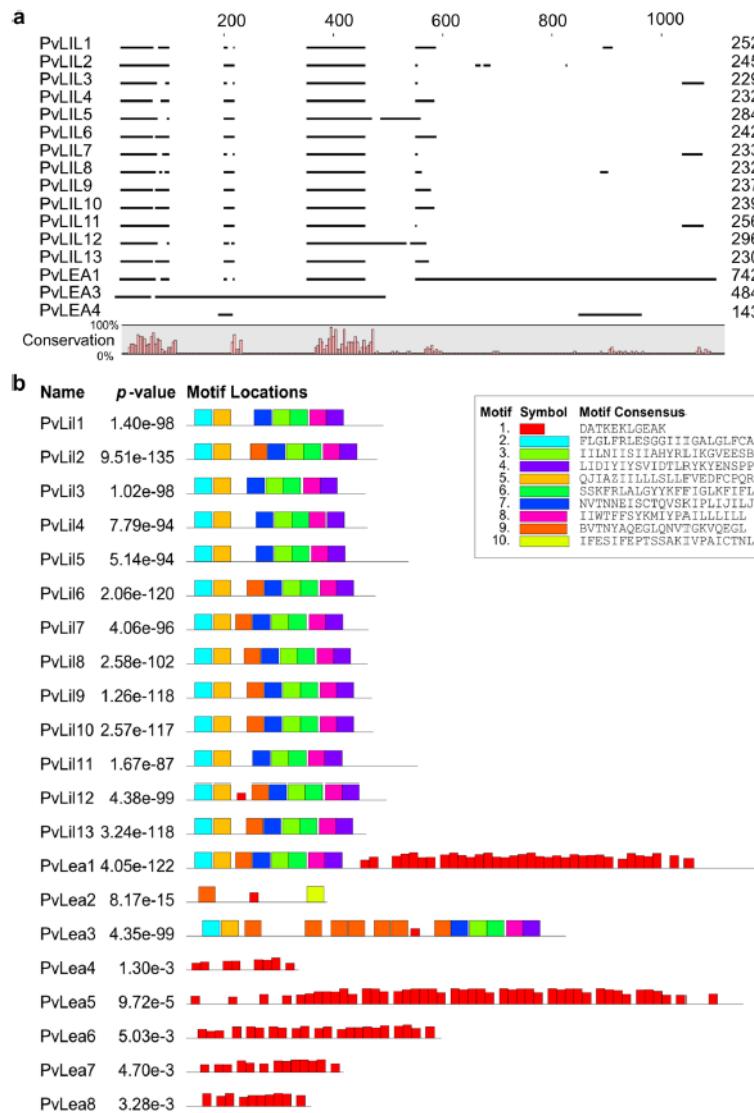


Рисунок 20 – Сходство белков PvLIL с PvLEA и распределение предсказанных мотивов. А) Множественное выравнивание 13 белков PvLIL и 3 белков PvLEA. Сходство ограничено N-концевым участком PvLEA1 и C-концевым участком PvLEA3. В) Состав аминокислотных мотивов у всех белков PvLIL и PvLEA1–PvLEA8. Для краткости из изображения исключены белки PvLEA9–PvLEA27. Максимальное число различных мотивов было задано равным 10, максимальная ширина — 22 аминокислотных остатка. Обнаруженные мотивы показаны цветными блоками, высота которых соответствует их статистической значимости (р-значению). Слева указаны названия белков и совокупное р-значение для всех мотивов каждой последовательности. Исключённые белки PvLEA9–PvLEA27 содержат от одного до четырёх мотивов типа №1 с совокупными р-значениями от $3,96 \cdot 10^{-22}$ до $1,19 \cdot 10^{-1}$; исключение составил PvLEA22, у которого мотивов типа №1 не выявлено.

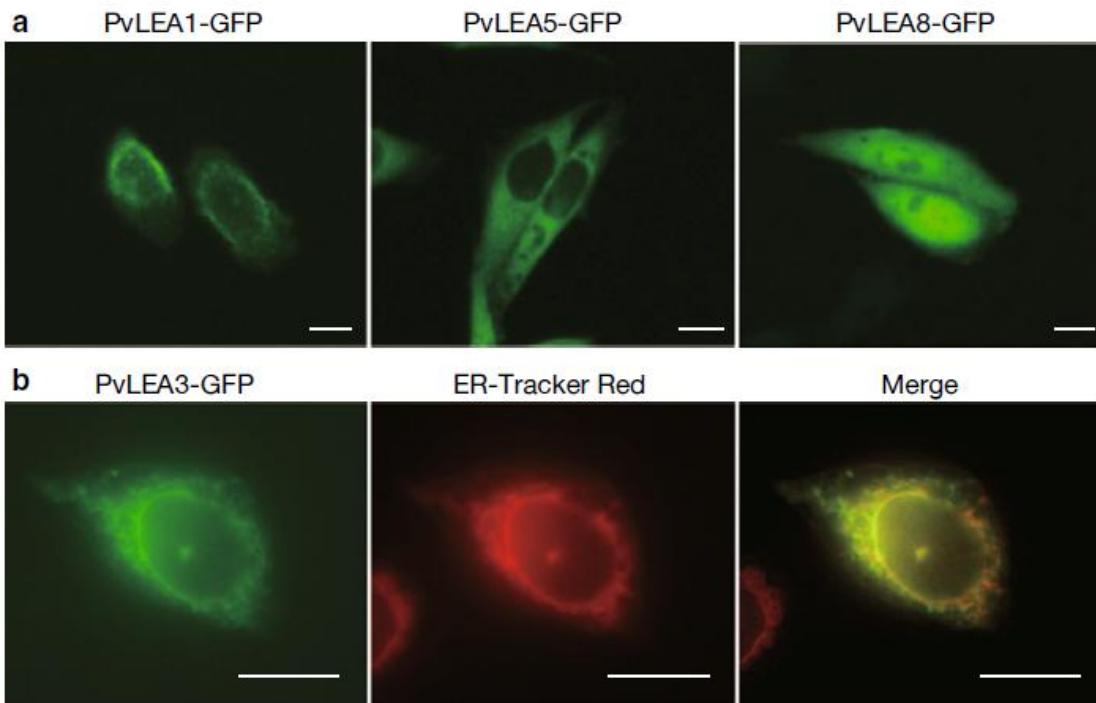


Рисунок 21 – Субклеточная локализация репрезентативных белков PvLEA, слитых с GFP, в клетках CHO. А) Локализация PvLEA1–GFP (специфично для плазматической мембраны), PvLEA5–GFP (специфично для цитозоля) и PvLEA8–GFP (цитозоль и ядро). В) Локализация PvLEA3–GFP; эндоплазматический ретикулум (ЭПР) селективно окрашен красителем ER-Tracker Red. Масштабная линейка — 10 мкм.

Транскриптомный анализ показал, что гены *PvLil* индуцируются при инициации ангидробиоза как в личинках *P. vanderplanki*, так и в клеточной линии *Pv11*. Кроме того, для личиночной стадии зафиксирован повышенный уровень экспрессии по сравнению с другими фазами жизненного цикла, что указывает на её специфическую роль в стресс-ассоциированных процессах именно на данном этапе онтогенеза. Совокупность профилей экспрессии подтверждает вовлечённость *PvLIL* в мембранный компонент защитного ответа на обезвоживание, дополняющий растворимую часть молекулярного «щита», формируемого LEA-белками.

Для одного из представителей семейства, *PvLil4*, идентифицирована альтернативная сплайс-форма с удержанием 42-нуклеотидного интрана, что приводит к укорочению N-концевого участка одной из изоформ приблизительно на треть. При этом в сохранившейся рамке считывания присутствуют несколько потенциальных старт-кодонов, указывающих на возможную изоформ-специфическую регуляцию и функциональную дивергенцию на посттранскрипционном уровне (Voronina et al., 2020).

Таким образом, полученные данные согласованно указывают на то, что *PvLil*-гены представляют собой специализированный мембранный модуль в составе кластера *ARId1*, эволюционно «подтянутый» к *LEA*-острову и ко-регулируемый с ним в условиях обезвоживания. На уровне белков *LIL*-семейство формирует трансмембранный «арматуру» — благодаря множественным ТМ-доменам и высоко консервативным остаткам в пределах этих сегментов, тогда как *LEA*-белки создают растворимую защитную матрицу, включающую варианты с различной субклеточной локализацией (цитозоль, ядро, ЭПР, аппарат Гольджи). Наличие химерной архитектуры у *PvLEA1* и *PvLEA3* подчёркивает функциональную интеграцию обоих защитных контуров в рамках единой клеточной системы, обеспечивающей устойчивость к экстремальной дегидратации (Voronina et al., 2020; Hatanaka et al., 2015; Kondratyeva et al., 2022).

3.3.4. Заключение к разделу

Совокупность полученных данных позволяет рассматривать устойчивость к дегидратации у *Polypodium vanderplanki* как результат согласованного функционирования нескольких комплементарных молекулярных модулей, объединённых общей регуляторной архитектурой *ARId*-кластеров.

Растворимая гидрофильная компонента, формируемая паралогами *LEA*, играет ключевую роль в стабилизации макромолекул и клеточного матрикса в критические периоды обезвоживания и восстановления. Мембранный составляющая, представленная *LIL*-белками и отдельными трансмембранными формами *LEA*, обеспечивает структурную целостность и функциональную организованность клеточных мембран и органелл. Ферментативный модуль, сосредоточенный в семействе *PIMT* и других *SAM*-зависимых метилтрансферазах, реализует функции постстрессовой коррекции — репарации белков и поддержания протеостаза, преимущественно на поздних этапах дегидратации и в фазе регидратации.

Координация между этими модулями достигается за счёт их геномной ко-локализации в пределах *ARId*-регионов и согласованной транскрипционной динамики. Временные «окна» экспрессии паралогов распределены таким образом, чтобы перекрывать ключевые фазы адаптационного цикла «обезвоживание → регидратация», а субклеточная локализация белковых продуктов обеспечивает пространственное разделение функций внутри одной клетки.

В результате формируется многоуровневая защитно-восстановительная система: *LEA*-белки стабилизируют растворимую часть клеточного содержимого, *LIL*-белки создают механико-структурный каркас мембран, а *PIMT*-контур завершает адаптивный цикл за счёт ферментативной коррекции повреждений и поддержания функциональной целостности белкового пула. Такая интегративная архитектура объясняет как воспроизводимость феномена ангидробиоза в различных экспериментальных системах, так и вариативность откликов между близкородственными видами при сохранении общей сетевой логики.

3.4. Полногеномный анализ экспрессии генов

3.4.1. Глобальная динамика экспрессии и регуляторная архитектура ангидробиоза

Поскольку личинки *P. vanderplanki* являются признанной моделью ангидробиоза на уровне целого организма, для молекулярной декомпозиции этого состояния мы использовали клеточную линию Pv11, полученную из эмбрионов *P. vanderplanki*. Десикационная устойчивость у клеток этой линии индуцируется 48-часовой экспозицией 600 мМ трегалозы с последующим возобновлением пролиферации после регидратации.

В анализе экспрессии генов мы опирались на CAGE-seq транскриптомное профилирование клеточной культуры Pv11, охватывающий шесть фаз: контроль без трегалозы (T0), 48-часовая преэкспозиция 600 мМ трегалозой (T48), раннюю и глубокую десикацию — 8 ч и 10 сут (D8 и D10d), а также раннюю и позднюю регидратацию — 3 ч и 24 ч (R3 и R24). Для сопоставления клеточных данных с транскриптомным ответом *in vivo* были проанализированы экспрессионные EST-библиотеки личинок *P. vanderplanki*, охватывающие три временные точки (pvD00, pvD12, pvD36; всего 15 056 EST, сгруппированных в 4 807 кластеров) (Cornette et al., 2010). Для оценки регуляторных сетей, контролирующих защитные программы связанные с ангидробиозом, мы по расширенному RNA-seq Pv11 восстановили регуляторную сеть и показали, что её верхний узел — транскрипционный фактор NF-YC. Через несколько контуров положительной обратной связи он активирует и удерживает «включённым» критические блоки ответа на десикацию, стабилизируя состояние ангидробиоза (Yamada et al., 2020).

Иерархическая кластеризация Pv11 показала максимальное расхождение профилей в «сухом» состоянии (D8/D10d) с последующим поэтапным «сближением» с контролем по мере регидратации (от R3 к R24) (Рисунок 22).

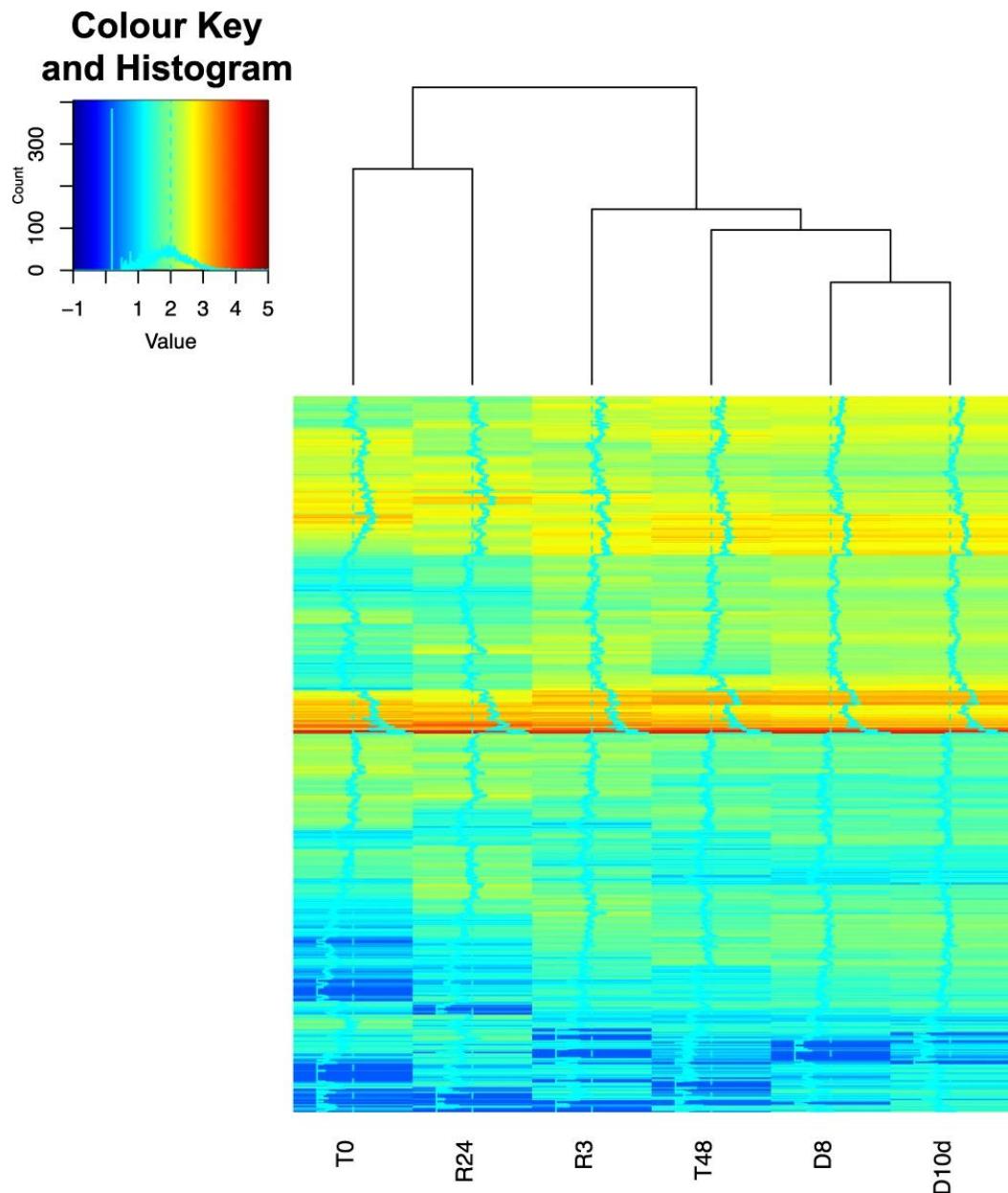


Рисунок 22 – Иерархическая кластеризация по значениям TPM (tags per million) для каждого образца (метрика расстояния — евклидова). На вставке «Цветовая шкала и гистограмма» по оси X показано значение $\log_{10}[\text{TPM} + \text{минимальное ненулевое TPM}]$, по оси Y — число дифференциальном экспрессируемых генов. В анализ включены гены, которые определялись как дифференциальном экспрессируемы хотя бы в одном парном сравнении образцов.

По числу дифференциально экспрессируемых генов (FDR<0,05) отмечены контрасты между T0 и T48 — 384 гена; T0 и D8 — 813; T0 и D10d — 974. Между D8 и D10d достоверных различий не выявлено, что указывает на стабилизацию аметаболического плато. По данным GO-анализа, при переходе от T0 к T48 отмечаются признаки ранней метаболической перестройки — преобладание процессов, связанных с метаболизмом и редокс-активностью, указывающее на начальную фазу подготовки к десикации (Рисунок 23).

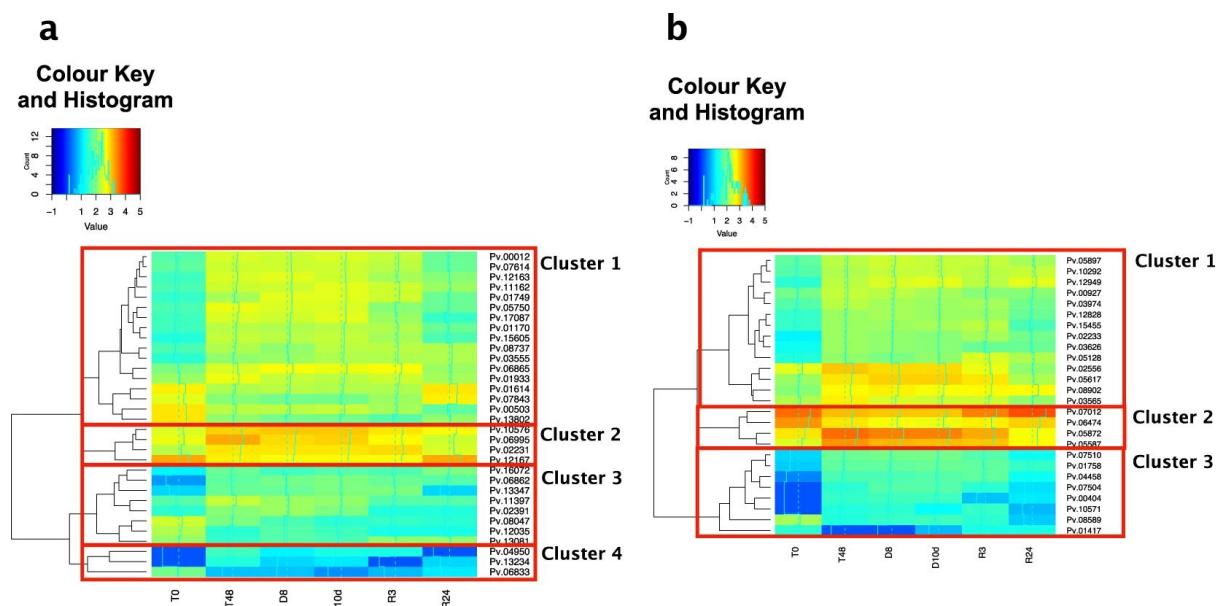


Рисунок 23 — Иерархическая кластеризация дифференциально экспрессируемых генов (ДЭ-генов), аннотированных терминами: А) GO:0008152 («метаболический процесс») и В) GO:0055114 («окислительно-восстановительный процесс»). Во вставках «Colour Key and Histogram» по оси X показаны значения $\log_{10}(\text{TPM} + \text{минимальное ненулевое значение TPM})$, по оси Y — число ДЭ-генов.

Сопоставление личинок *P. vanderplanki* и чувствительного вида *P. nubifer* показывает, что «ядро» ответа (LEA/TRX/PIMT, а также Hb, Aqp и компонентов трегалозного пути) характерны для устойчивой к дегидратации линии, тогда как у *P. nubifer* не наблюдается сопоставимого

включения этих программ и отсутствуют гомологи ряда ключевых стресс-ассоциированных генов (Yamada et al., 2018).

3.4.2. Эффекторные модули ангидробиоза: «ядро» генов и процессы

Преэкспозиция трегалозой (от Т0 к Т48) сопровождается согласованным повышением транскриптов антиоксидантных и детоксификационных систем, включая тиоредоксины PvTrx1-1/3/7/10, глутатион-S-трансферазы, УДФ-глюкуронозилтрансферазы и карбоксилэстеразы, а также активацией путей контроля качества РНК. В фазе десикации (D8/D10d) наблюдается двунаправленный сдвиг: с одной стороны активируются протеостатические программы, с другой — подавляется активность трансляционного аппарата. Ключевыми молекулярными компонентами в этот период выступают LEA-белки и белки семейства HSP, выполняющие защитную роль в качестве «молекулярных щитов», а также PIMT-метилтрансферазы, участвующие в восстановлении белков с изоаспартил-повреждениями (Yamada et al., 2018; Cornette, 2010). На уровне транспорта и метаболизма формируется согласованный ответ между клеточной моделью и целым организмом. У личинок индуцируются ферменты синтеза трегалозы (TPS/T6PP) и переносчик Tret1, тогда как на поздних стадиях десикации повышается экспрессия трегалазы, что обеспечивает быстрое использование запасенной трегалозы после регидратации (Рисунок 24).

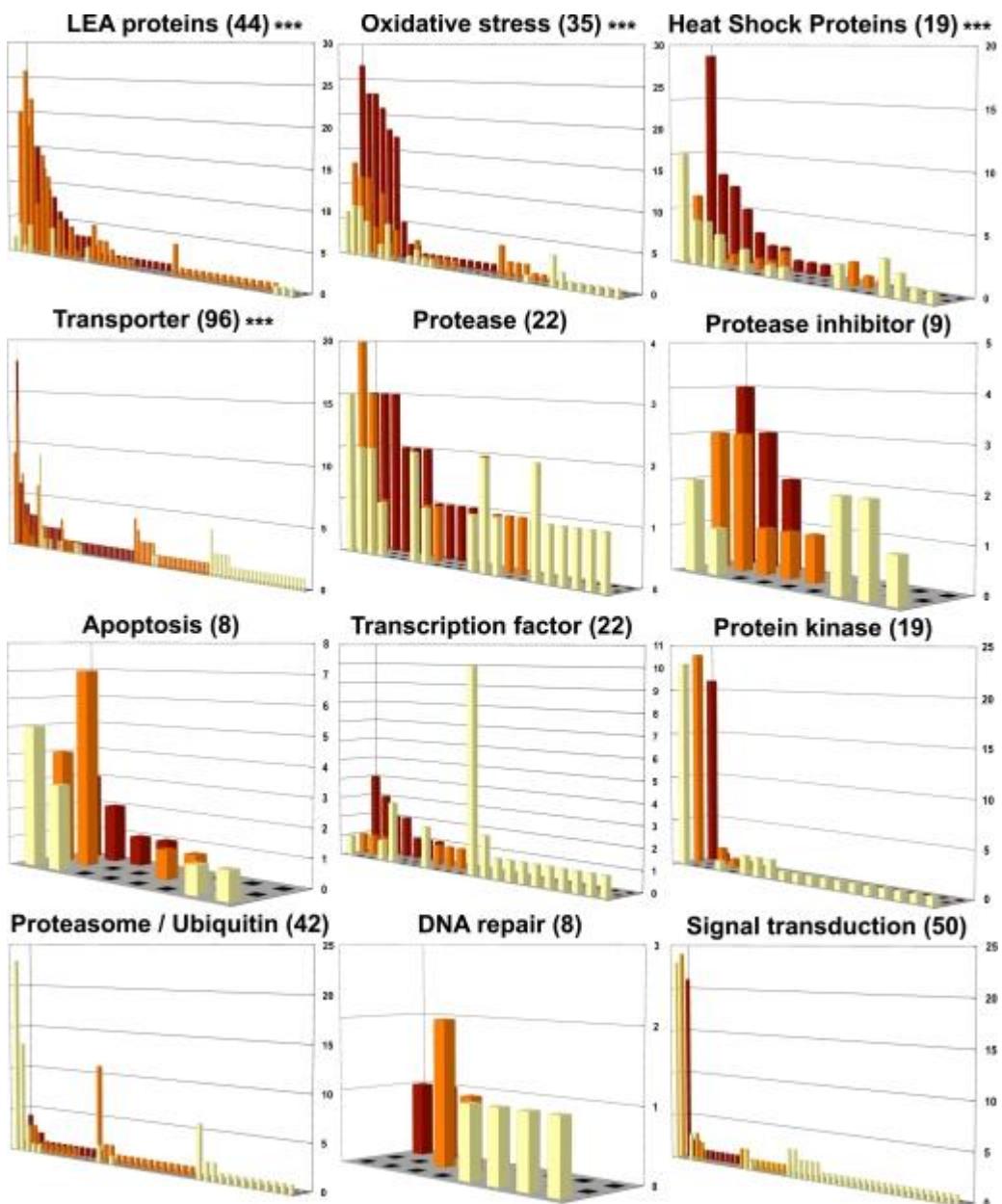


Рисунок 24 – Профили экспрессии для выбранных групп кластеров, определённых по функциональным ключевым словам. Ось X — номера кластеров; ось Y — число EST в каждом кластере; ось Z — профиль экспрессии, представленный числом EST на 0 ч (жёлтые столбцы), 12 ч (оранжевые) и 36 ч (красные) после начала десикации. Общее число кластеров в каждой группе указано в скобках. Справа показана статистическая значимость изменений долей между тремя библиотеками (критерий χ^2 ; *** — $p<0,0001$).

Анализ EST-библиотек дополнительно выявляет аква- и глицеропорины, а также гемоглобины, что указывает на активную

перестройку водно-солевого баланса, системы транспорта газов и редоксгомеостаза (Рисунок 25, 26)

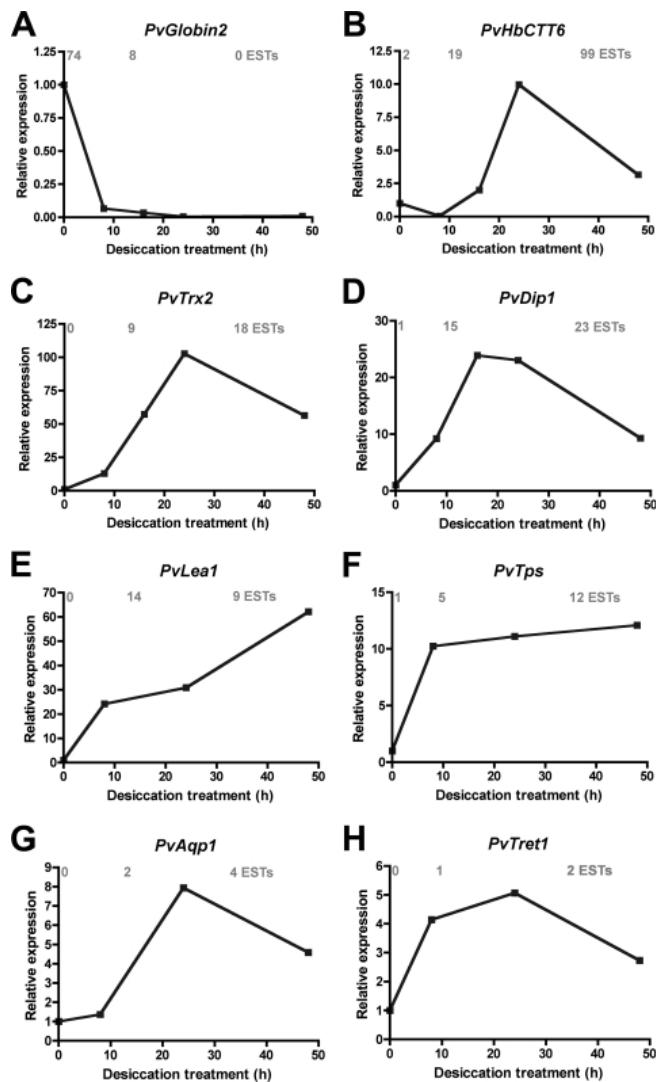


Рисунок 25 – Валидация результатов транскриптомных данных. Относительные профили экспрессии выбранных генов. Уровни экспрессии получены методом количественной ПЦР в реальном времени в первые 48 ч десикации для: глобина 2 (А), гемоглобина СТГ6 (В), тиоредоксина 2 (С), белка, индуцируемого десикацией 1 (Д), белка LEA 1 (Е), синтазы трегалозо-6-fosфата (F), аквапорина 1 (G) и переносчика трегалозы 1 (H). Соответствующие номера доступов: AB513664, AB513663, AB513662, AB513665, AB207255, AB490332, AB281619 и AB272983. Относительные уровни рассчитаны по отношению к экспрессии фактора элонгации 1 (панели А–Д) или рибосомного белка L32 (панели Е–Н) и откалиброваны так, что уровень при 0 ч десикации принят за 1,0. Числа EST для 0, 12 и 36 ч десикации из соответствующих кластеров базы данных указаны серым над каждым графиком.

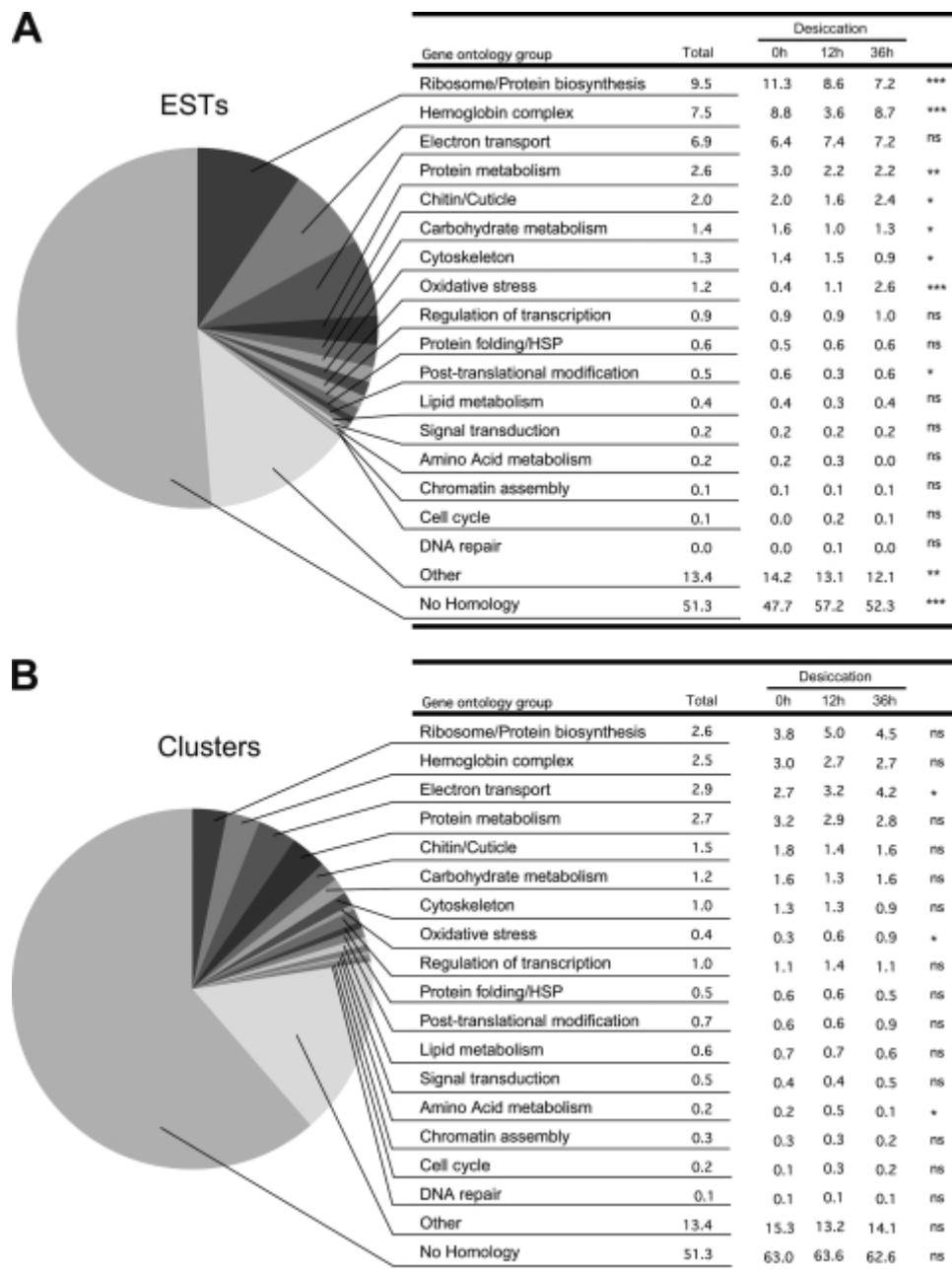


Рисунок 26 – Клоны EST, классифицированные по генной онтологии. Панели А и В показывают общие доли EST (А) и кластеров (В) по каждой онтологической группе для всей базы данных. Подробные проценты EST и кластеров по группам онтологии для трёх библиотек (десикация 0, 12 и 36 ч) приведены в таблицах справа. Справа также указана статистическая значимость изменений долей между тремя библиотеками (критерий χ^2 ; ns — незначимо; * — $p<0,05$; ** — $p<0,001$; *** — $p<0,0001$).

Таким образом, сопоставление данных ангидробиотической культуры клеток Pv11 и личинок позволяет выделить общее «ядро» эфекторных блоков ангидробиоза. В него входят антиоксидантная защита (TRX), протеостаз (LEA/HSP/PIMT), регуляция метаболизма трегалозы, транспорт воды и сахаров. При этом дополнительный вклад вносят детоксикация ксенобиотиков и системы контроля качества РНК (Yamada et al., 2018; Cornette et al., 2010).

3.4.3. Регуляция репаративных путей и контроль геномной целостности в условиях десикации и регидратации

Переходя к молекулярным механизмам, обеспечивающим поддержание геномной целостности в «сухой» и регидратированной фазах, можно отметить четкую перестройку транскриптомной активности, затрагивающей ключевые пути ДНК-репарации. В десикации статистически значимо повышаются транскрипты путей устранения двуцепочечных разрывов, включая гомологичную рекомбинацию (HR) — RAD51, RAD50, XRCC3, DMC1 с характерным, достоверным повышением уровней транскриптов (TPM) при сопоставлении с D10d. Параллельно индуцируются элементы негомологичного соединения концов (NHEJ), включая Ки-комплекс и лигазу IV (Pv.10272, гомолог XRCC5/Ku80, и Pv.15195, гомолог LIG4), с подъёмом TPM в сравнении T0 с D8, T0 с D10d, а для LIG4 — также и на фазе T48. Это указывает на активность систем устранения ДНК-повреждений именно в «сухой» фазе. В то же время, гены, вовлечённые в эксцизионную репарацию нуклеотидов (NER), демонстрируют повышенную транскрипционную активность как в условиях обезвоживания, так и после регидратации (XPA, ERCC3/XPB, GTF2H4, GTF2H2, CCNH). Такое распределение согласуется с ролью NER в устранении одноцепочечных повреждений, актуальных на раннем этапе

выхода из ангидробиоза. Для генов, отвечающих за репарацию ошибок спаривания (MMR), статистически значимой индукции не зафиксировано. В совокупности HR и NHEJ доминируют в десикации, а NER сохраняет активность и при восстановлении метаболической активности. Характерным ранним маркёром восстановления выступает Pv.07646 — Rad16-подобный ген, специфически индуцируемый через 3 часа после начала регидратации, что указывает на быстрый запуск NER-сценария при «включении» метаболизма (Рисунок 27) (Yamada et al., 2018).

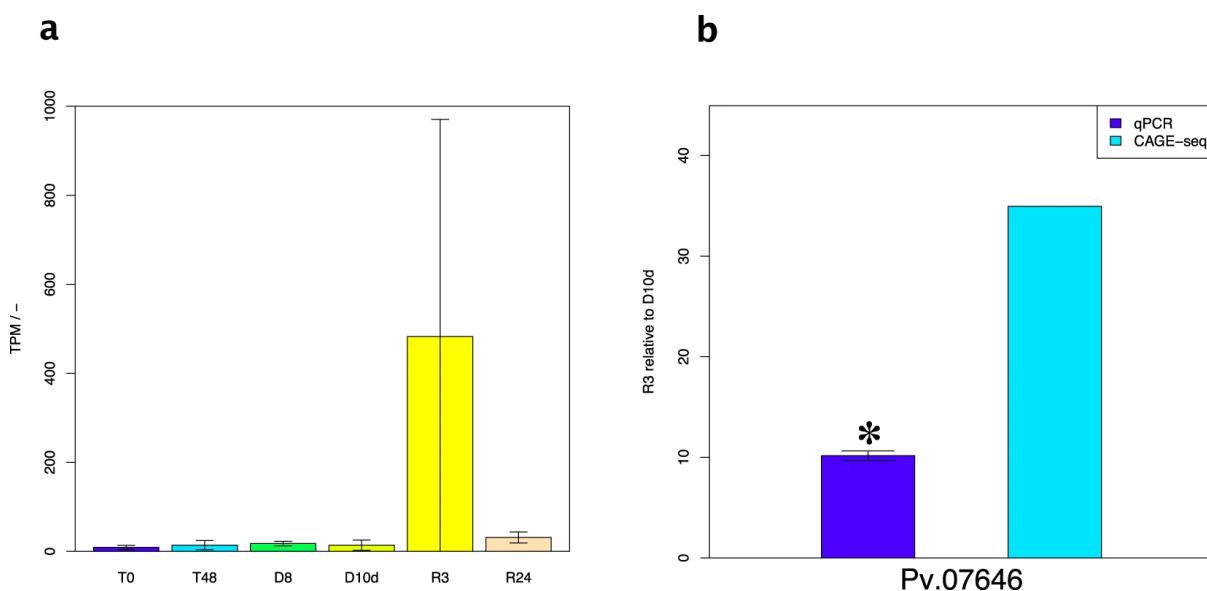


Рисунок 27 – Экспрессия Pv.07646, оценённая по RNA-seq и RT-qPCR. А) Экспрессия Pv.07646, аннотированного терминами GO:0036055 (десуцинилирование сукцинил-лизина белков) и GO:0036049 (десуцинилирование пептидил-лизина). По оси X — названия образцов; по оси Y — TPM (tags per million). Данные представлены как среднее ± SD, n = 3. В) Кратность изменения (fold change) между R3 и D10d по данным RT-qPCR и CAGE-seq. * — значимое изменение по критерию t Уэлча ($p < 0,05$).

Реконструкция регуляторной сети по расширенному RNA-seq Pv11 позволила идентифицировать центральный управляющий элемент — субъединицу С ядерного фактора Y (NF-YC), входящую в состав тримерного комплекса NF-Y (субъединицы A, B, C), распознающего

промоторный мотив ССААТ. Модель указывает на наличие устойчивых контуров положительной обратной связи, через которые NF-YC координирует включение и поддержание транскрипции генов, участвующих в ангидробиотическом ответе. К таким генным блокам относятся LEA и TRX, аквапорины и гемоглобины, ферменты трегалозного пути, а также гены, обеспечивающие восстановление ДНК-повреждений (Рисунок 28)

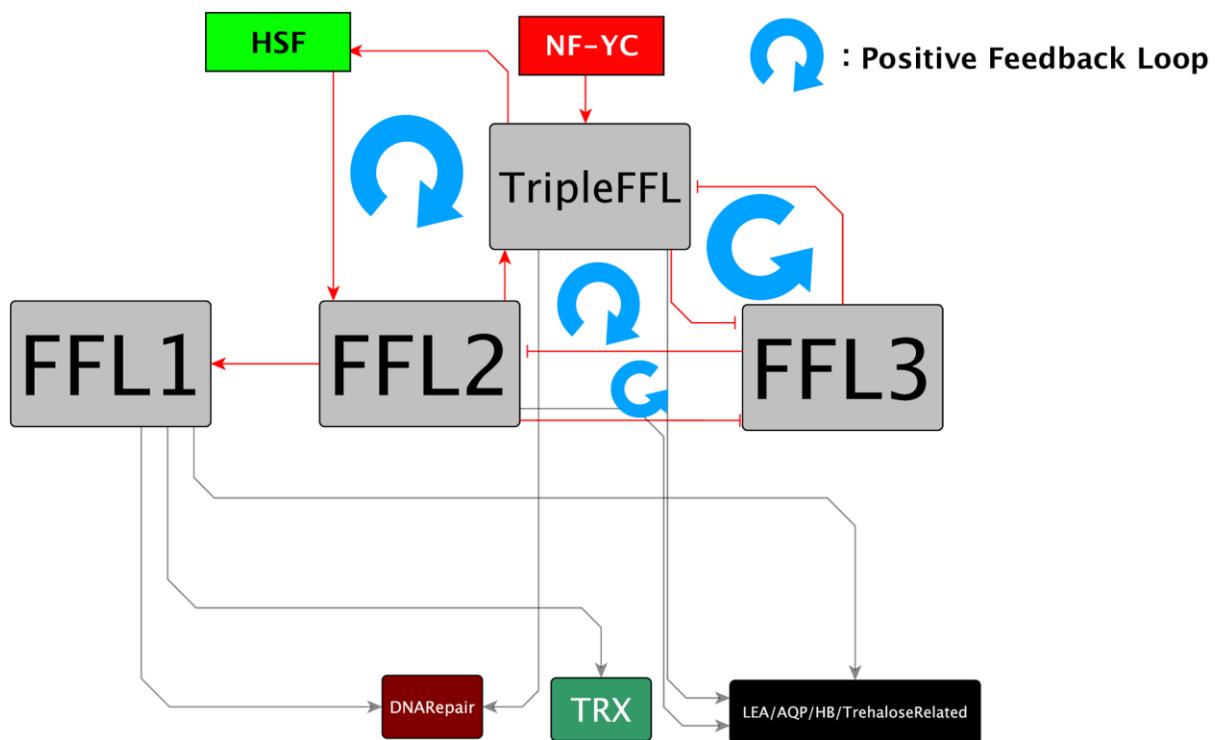


Рисунок 28 – Окончательная свернутая регуляторная сеть генов, обеспечивающая устойчивость к десикации в клетках Pv11. Сеть включает четыре положительных контура обратной связи (FBL): между блоками TripleFFL и FFL3; между FFL2 и FFL3; между TripleFFL, FFL2 и FFL3; а также между HSF, TripleFFL и FFL2. Модули, содержащие гены ангидробиоза — белки поздней эмбриогенеза (LEA), тиоредоксиновую систему (TRX), гемоглобины (HB), аквапорины (AQP), а также гены синтеза трегалозы и поддержания целостности ДНК — регулируются гомологом NF-YC через эти четыре положительных контура обратной связи.

На уровне целого организма транскрипт субъединицы NF-YC у личинок *P. vanderplanki* повышаются после высушивания и особенно в первые часы регидратации. У близкородственного чувствительного вида *P. nubifer* подъём фиксируется без связности с ключевыми защитными модулями, что указывает на отсутствие координированного включения ангидробиотической программы (Yamada et al., 2018; Yamada et al., 2020).

3.4.4. Заключение к разделу

Транскриптомный профиль клеточной линии Pv11 при ангидробиозе характеризуется максимальным расхождением экспрессии в «сухом» состоянии по сравнению с контрольной фазой (T0), с последующей поэтапной нормализацией в ходе регидратации. Уже на докритической стадии включаются метаболические и редокс-программы, отражающие подготовку к обезвоживанию. Эффекторное «ядро» транскрипционного ответа, устойчиво воспроизводимое как в клетках Pv11, так и в личинках, включает антиоксидантные механизмы (TRX), блоки протеостаза (LEA, HSP, PIMT), ферменты трегалозного метаболизма и транспортёры воды и сахаров, с дополнительным участием детоксикационных систем и компонентов контроля качества РНК. Поддержание геномной целостности смещается от доминирования путей устранения двуцепочечных разрывов в десикации (HR/NHEJ) к устойчивой активности эксцизионной репарации нуклеотидов при выходе из ангидробиоза. Характерным ранним маркёром восстановления выступает Rad16-подобный ген Pv.07646, специфически индуцируемый в первые часы после регидратации. Центральным элементом регуляторной архитектуры выступает субъединица С ядерного фактора Y (NF-YC), активирующая ключевые модули защитного ответа через сеть положительных контуров обратной связи. Сравнительный анализ с *P. nubifer* подчёркивает специфичность этих программ для устойчивой к

обезвоживанию линии *P. vanderplanki* (как на уровне личинок, так и в клеточной модели Pv11).

3.5. HSF-центричная регуляция ангидробиоза и индукция белков теплового шока у *Polypedilum vanderplanki*

3.5.1 Экспрессионная характеристика Hsf и семейств Hsp при дегидратации и регидратации у *Polypedilum vanderplanki* (временные профили, фазовая специфика)

Фазовый транскриптомный анализ генов теплового шока и связанных с ними факторов (*HSF/HSP*) у личинок *Polypedilum vanderplanki* выявил раннюю активацию регуляторного звена и последующую каскадную индукцию шаперонов с различной временной спецификой (Kozlova et al., 2018). Транскрипционный фактор *Pv-hsf1* демонстрирует увеличение экспрессии уже на начальных этапах входа в обезвоживание, отражая запуск стресс-ответной программы. Профили экспрессии *Pv-hsf1* представлены на рисунке 29, наряду с динамикой одного из ключевых шаперонов — *Pv-hsp90* (Gusev et al., 2011; Nesmelov et al., 2018).

Графики построены с расчётом уровней относительной экспрессии по отношению к гидратированному контролю и снабжены доверительными интервалами, что позволяет проводить корректное сравнение амплитудных изменений на различных фазах дегидратации и регидратации (Рисунок 29, А, В, Д, Е).

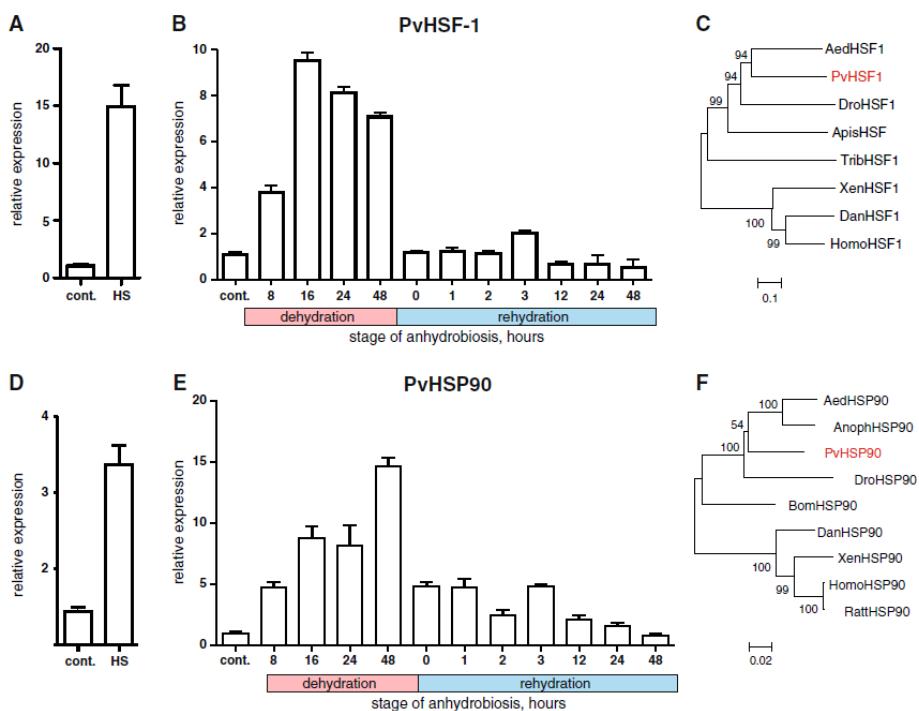


Рисунок 29 – Относительные уровни экспрессии мРНК Pv-hsf1 и Pv-hsp90 у личинок *Polypedilum vanderplanki* в условиях теплового шока (панели А, Д) и ангидробиоза (панели В, Е). Значения нормированы по экспрессии PvEf1-alpha и представлены относительно контрольных гидратированных личинок (контроль = 1). Ошибки отражают среднее значение $\pm 95\%$ доверительный интервал, рассчитанный на основе трёх биологических повторов. Обозначение cont. — контрольные, гидратированные особи. На панелях с и f показаны дендрограммы, построенные методом соседних соединений (neighbor-joining), иллюстрирующие филогенетические взаимоотношения аминокислотных последовательностей Pv-HSF1 и Pv-HSP90 соответственно.

Дополнительный сравнительно-геномный анализ выявил признаки автоиндукции транскрипционного фактора *Pv-hsf1*. Установлено, что в условиях стресса наблюдается усиление его собственной транскрипции (в 3,7 и 1,3 раза в зависимости от условий воздействия), что сопровождается обогащением HSF-специфичного консенсус-мотива *TCTAGAA* в промоторных областях дегидратационно-активируемых генов (в пределах $\pm 1\ 000$ нт от предполагаемого сайта инициации транскрипции). Эти данные

согласуются с моделью прямого участия *Pv-HSF1* в регуляции дегидратационного ответа (Рисунок 30, E–F).

Члены семейства *HSP70* демонстрируют разнесённые по фазам транскрипционные профили. Индуцируемая изоформа *Pv-hsp70* формирует характерный двухпиковый паттерн: первый достоверный подъём экспрессии наблюдается на временной точке D-8, с максимумом к D-48, за которым следует второй пик на R-3; далее, к R-24, уровень возвращается к условно стабильному фону (Рисунок 30, E). При этом амплитуда индукции *Pv-hsp70* в фазе дегидратации ниже, чем у конститутивной изоформы *Pv-hsc70* (Рисунок 30).

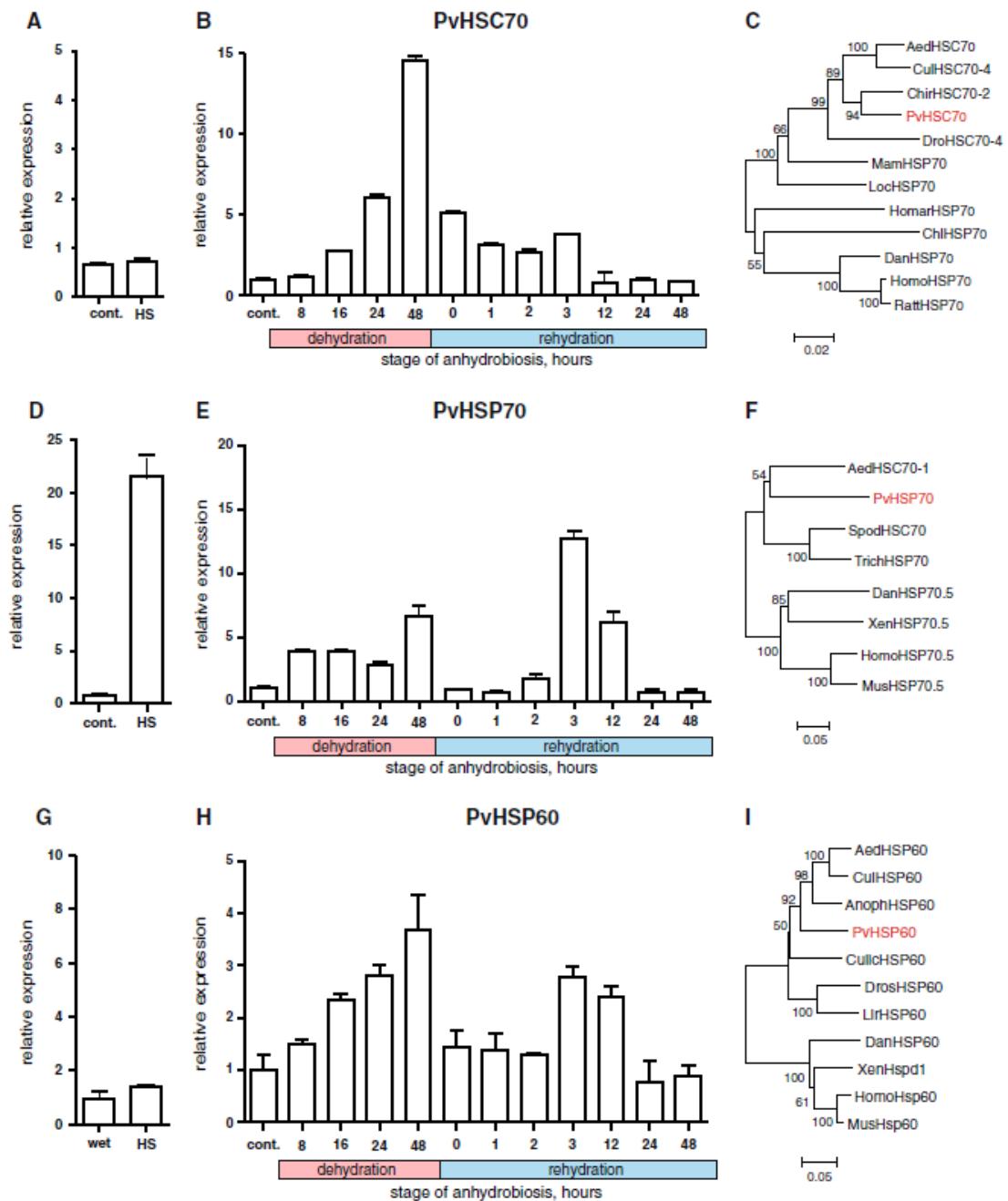


Рисунок 30 – Относительные профили мРНК Pv-hsp70, Pv-hsc70 и Pv-hsp60 у личинок в условиях ангиобиоза (B, E, H) и теплового шока (A, D, G). Значения уровня мРНК для каждого гена нормированы по экспрессии PvEf1-alpha; относительный уровень изменений рассчитывался по сравнению с контрольными гидратированными личинками (значение = 1). Погрешности представлены в виде среднего значения $\pm 95\%$ доверительного интервала для трёх биологических повторностей. cont. — контрольные гидратированные личинки. На панелях c, f, i показаны дендрограммы аминокислотных последовательностей Pv-HSC70 и Pv-HSP60, построенные методом соседних соединений.

Сходная двухволновая динамика зафиксирована и для *Pv-hsp60*: начальный подъём регистрируется уже на D-8, с суммарным увеличением уровня транскрипции в 2–4 раза к D-48, после чего наблюдается повторное усиление экспрессии в течение первых часов регидратации (Рисунок 30, G–H). При этом *Pv-hsp60* не относится к числу классических тепловых шаперонов, что подчёркивает его специфическую роль в ответе именно на обезвоживание.

На этом фоне *Pv-hsp90* демонстрирует устойчивую повышенную экспрессию на этапе входа в ангидробиоз и в раннюю фазу восстановления. В совокупности с *HSC70* и индуцируемым *HSP70* он формирует базовый шапероновый модуль, задействованный в укладке и восстановлении белковой конформации в пиковые моменты стрессового воздействия и в фазе восстановления протеостаза (Gusev et al., 2011).

Малые а-кристаллин-подобные шапероны вносят дополнительный, фазово-диверсифицированный вклад в молекулярный ответ на обезвоживание. Так, *Pv-hsp20* демонстрирует раннюю активацию: его экспрессия возрастает уже на стадии D-8 и сохраняется на повышенном уровне не менее 24 часов после регидратации. Такой профиль схож с динамикой *Pv-hsp90* и *Pv-hsf1*, указывая на участие *Pv-hsp20* в ранней защите белковых структур (Рисунок 31).

В отличие от него, *Pv-p23* практически не экспрессируется в гидратированных и полусухих личинках, однако демонстрирует резкий подъём экспрессии в интервале между D-24 и D-48, соответствующем переходу к предвитрификационной фазе. Такая дегидратационно-специфичная экспрессия согласуется с функцией p23-подобных белков в стабилизации макромолекулярных комплексов на поздних этапах высушивания, в том числе в условиях стеклообразного состояния (Gusev et al., 2011).

Обобщённая времененная организация экспрессии HSP-компонентов, представленная на рисунке 31, позволяет выделить последовательную каскадную архитектуру шаперонного ответа: инициальная активация *Hsf* → пик экспрессии крупных шаперонов (*HSP90*, *HSP70*, *HSP60*) в интервале D-24–D-48 → вторичные пики *HSP70/HSP60* в фазе регидратации. Этот ответ дополняется ранним участием малого шаперона *Pv-hsp20* и поздним включением потенциального «стеклообразующего» белка *Pv-p23*, обеспечивая многоуровневую защиту белкового пула в течение всего цикла ангидробиоза (Gusev et al., 2011; Nesmelov et al., 2018).

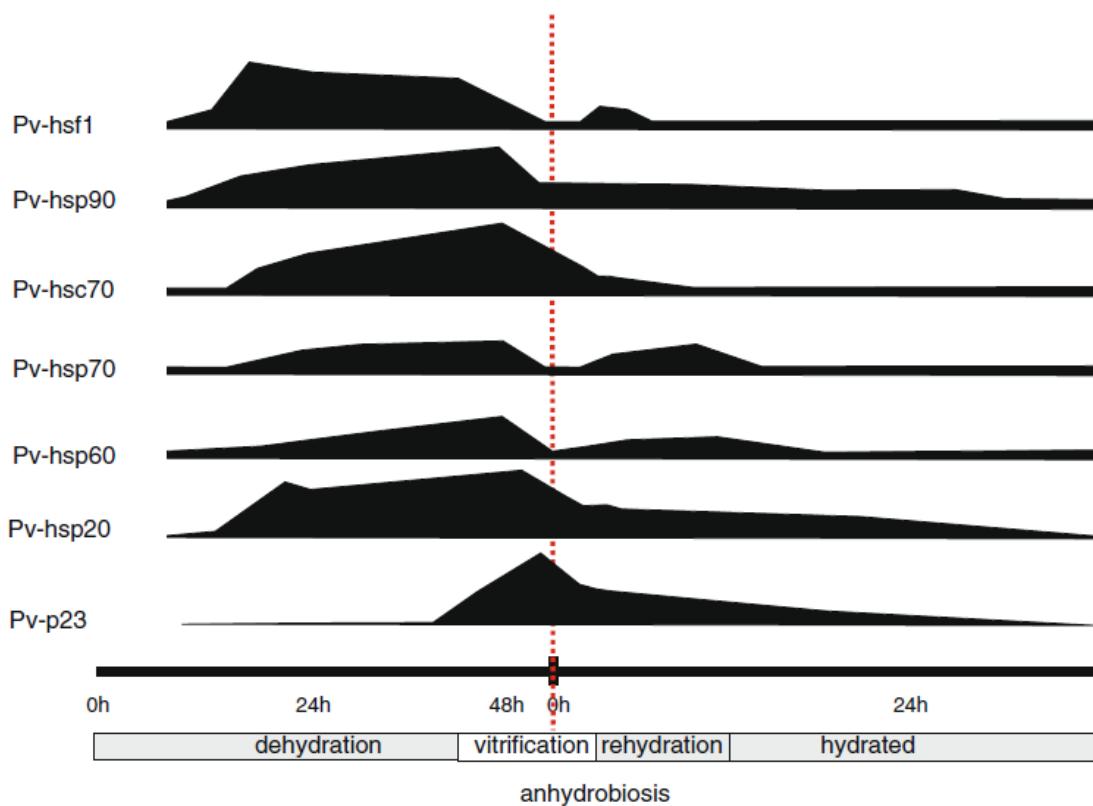


Рисунок 31 – Временная схема стадий ангидробиоза, на которых у личинок хирономиды *Polypedilum vanderplanki* наблюдается повышение экспрессии генов, кодирующих белки теплового шока.

Регуляторная привязка полученных результатов подтверждается независимыми наборами данных. В клеточной модели *Pv11* трегалозная прекондиционирующая обработка вызывает активацию *Hsf* и сопровождается статистически значимым обогащением промоторных

регионов индуцируемых генов специфическим мотивом *TCTAGAA* (Fisher's exact test, $P < 0,0005$; коэффициент обогащения OR $\approx 1,7$). Среди 99 генов, ко-активируемых как у личинок (в ответ на десикацию), так и в *Pv11* (в ответ на трегалозу), у 33 (33%) обнаружено наличие указанного мотива, что значительно превышает уровень в фоновом наборе ($\sim 12\%$), при ожидаемом по случайности числе 12/99. Это позволяет предположить, что по меньшей мере ~ 21 из 33 кандидатов представляют собой прямые транскрипционные мишени *Hsf*.

Функциональная значимость *Hsf*-опосредованной регуляции подтверждается экспериментами по подавлению экспрессии гена *Hsf* с использованием *siRNA* (*HSF-200*). Сайленсинг этого транскрипционного фактора приводит к значительному снижению экспрессии большинства предсказанных мишеней (18 из 21; *t*-тест с коррекцией по Бенджамини–Хохбергу, $P < 0,05$) и к сокращению выживаемости клеток *Pv11* после десикации примерно на 80%. Эти данные подчёркивают центральную роль *Hsf* в координации молекулярного ответа на стресс, инициируемый обезвоживанием (Mazin et al., 2018).

3.5.2. Регуляторная архитектура HSF: обогащение мотивов в промоторах десикационно-индуцируемых генов и признаки авторегуляции

Геномно-транскриптомный анализ выявил, что ДНК-мотив *TCTAGAA*, структурно близкий к сайту связывания теплового транскрипционного фактора дрозофилы (по результатам анализа *TOMTOM*, *FlyFactorSurvey*, $P < 0,0004$), статистически обогащён в промоторных областях генов, индуцируемых при десикации у *Polypedilum vanderplanki*. У близкородственного, чувствительного к обезвоживанию вида *P. nubifer*

достоверной ассоциации с данным мотивом не обнаружено (Fisher's exact test, $P = 0,59$; OR = 0,87) (Рисунок 32 А).

Позиционный анализ показал кластеризацию мотивов *TCTAGAA* в пределах $\pm 1\ 000$ нт от предполагаемого сайта инициации транскрипции (TSS) именно у десикационно-активируемых генов *P. vanderplanki* (Рисунок 32 В). Среди функциональных категорий наибольшее обогащение наблюдается в группах генов, кодирующих LEA-белки, тиоредоксины и шапероны (Fisher's exact test: $P < 0,007$; $P < 0,01$; $P < 0,0008$ соответственно). Эти выводы подтверждаются независимым анализом с использованием позиционно-весовых матриц (HOMER), выявившим наиболее значимый мотив (*TCTAGAAAGA*) в промоторных участках 33% генов, значительно активируемых через 48 часов после начала десикации.

Количественная оценка масштаба регуляторного влияния *HSF* показала, что размер предполагаемого «*TCTAGAA*-регулона» в обоих видах сопоставим (~300 генов), однако состав этих регуляторных сетей существенно различается. Гены, содержащие мотив *TCTAGAA* в промоторе у *P. vanderplanki*, но лишённые его у *P. nubifer*, статистически чаще демонстрируют более выраженную индукцию в ответ на обезвоживание у первого вида (Fisher's exact test, $P < 10^{-4}$; OR = 1,4). Зеркального эффекта в сторону *P. nubifer* не выявлено (Рисунок 32 F, D). Кроме того, у *P. vanderplanki* промоторные области индуцируемых генов обогащены HSE-паттернами — сериями 2–4 мотивов с чередующейся ориентацией, соответствующими модели активной тримеризации *HSF*.

Регуляторная активность *HSF* охватывает ключевые эффекторные звенья ангидробиоза. Так, у *P. vanderplanki* три из четырёх генов, участвующих в метаболизме трегалозы (включая *TPS*), содержат *TCTAGAA*-мотив в промоторах, в то время как у *P. nubifer* он отсутствует. При десикации экспрессия *TPS* у *P. vanderplanki* увеличивается более чем в 4 раза, тогда как у *P. nubifer* подобной активации не наблюдается (Рисунок 32

C). Наряду с данными об обогащении мотивов в промоторах *LEA*, тиоредоксинов и HSP, это поддерживает модель *HSF*-центрической координации защитных путей, активируемых в ответ на обезвоживание у *P. vanderplanki*.

Дополнительно выявлены признаки авторегуляции гена *Hsf*. Во-первых, экспрессия *Hsf* у личинок *P. vanderplanki* возрастает в ходе десикации, а в клеточной модели *Pv11* усиливается при трегалозной прекондиции (Рисунок 32 Е). Величины подъёма составляют 3,7- и 1,3-кратные изменения, соответственно, что может свидетельствовать о механизме самоактивации. Во-вторых, в промоторной области *Pv.Hsf* обнаружены два сайта *TCTAGAA* с интерспейсером <50 нт — структурная конфигурация, крайне редко встречающаяся в геноме. В отличие от этого, у *Pn.Hsf* (*P. nubifer*) соответствующий сайт отсутствует, что коррелирует с более слабой транскрипционной реакцией на стресс. Обогащение мотивов подтверждено как методом гексамерного анализа, так и подходами с использованием PWM (HOMER), а также подтверждено их позиционной локализацией вблизи TSS (Рисунок 32 В, Е) (Mazin et al., 2018).

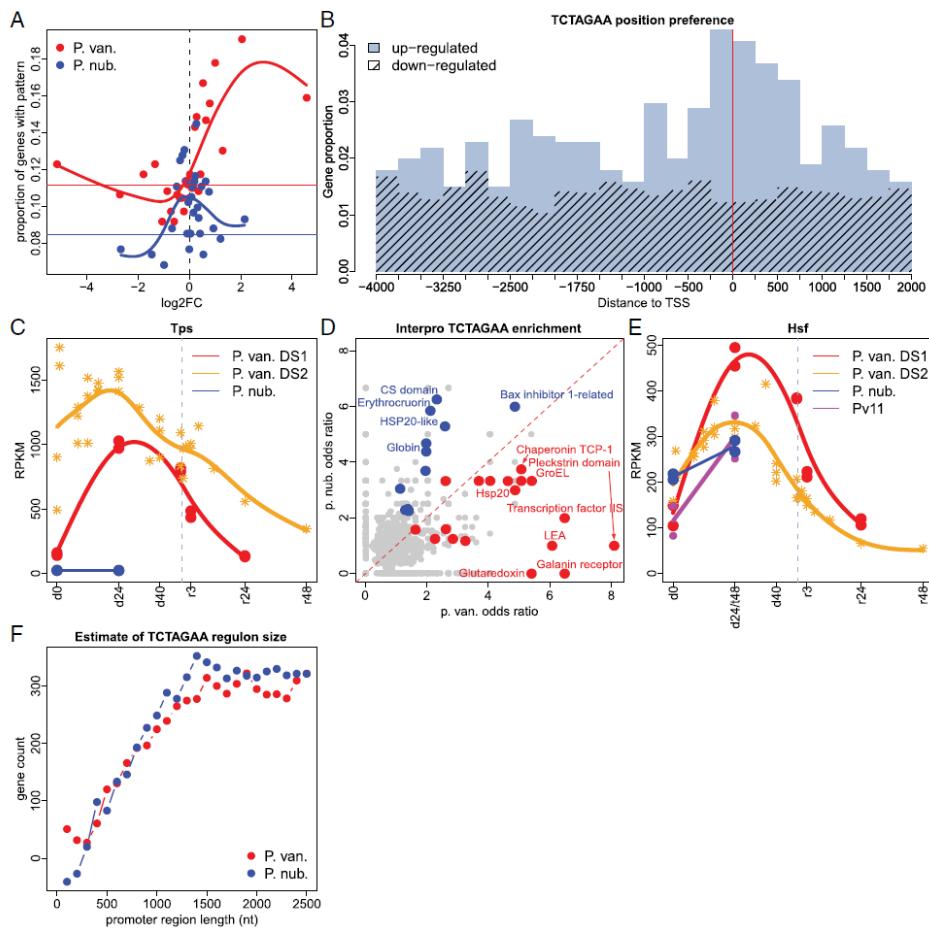


Рисунок 32 – Активация генов Hsf при десикации у *P. vanderplanki* и *P. nubifer*. А) Доля генов с мотивом TCTAGAA в промоторе в зависимости от среднего log₂-fold изменения экспрессии: *P. vanderplanki* (красная линия) и *P. nubifer* (синяя). Гены сгруппированы скользящим окном по 100 генов с близким fold-change. В) Позиционное распределение сайта TCTAGAA относительно начала первого экзона (ось X, нт) у *P. vanderplanki* для индуцируемых (серый) и подавляемых (чёрный) генов. С) Динамика экспрессии гена TPS (трегалозо-6-фосфатсингазы) при десикации у *P. vanderplanki* и *P. nubifer*. Д) Обогащение (отношение шансов, OR) семейств InterPro генами с сайтом TCTAGAA в промоторе: *P. vanderplanki* (ось X) и *P. nubifer* (ось Y). Цвет: красный — $P < 0,01$ у *P. vanderplanki*, синий — у *P. nubifer* (тест Фишера). Значимого обогащения в обеих видах одновременно не выявлено. Е) Уровни транскрипции Hsf в личинках при десикации и в клетках Pv11 после трегалозной прекондиции. F) Оценка размера TCTAGAA-регулона в геномах *P. vanderplanki* (красный) и *P. nubifer* (синий): разность между числом генов с сайтом в промоторе (± 1000 нт от TSS) и числом таких сайтов в контрольной области примерно на 4000 нт выше TSS.

Функциональная значимость HSF-регуляции подтверждена на независимой системе (Pv11). Среди 99 генов, активируемых как в личинках *P. vanderplanki* при десикации, так и в Pv11 после трегалозной прекондиции, 33 (33%) содержат мотив *TCTAGAA* в промоторной области, что значительно превышает фоновый уровень (~12%). При ожидаемом по случайности числе 12/99, можно предположить, что порядка 21 из 33 генов являются вероятными прямыми мишениями *Hsf*.

Экспериментально показано, что сайленсинг *Hsf* с использованием siRNA (HSF-200) подавляет трегалозо-индуцированную транскрипционную активацию большинства из проверенных генов (18 из 21; t-тест, ВН-коррекция, $P < 0,05$), что подтверждает вклад HSF как ключевого транскрипционного регулятора в активации протекторных генов при запуске ангидробиоза (Рисунок 33) (Mazin et al., 2018).

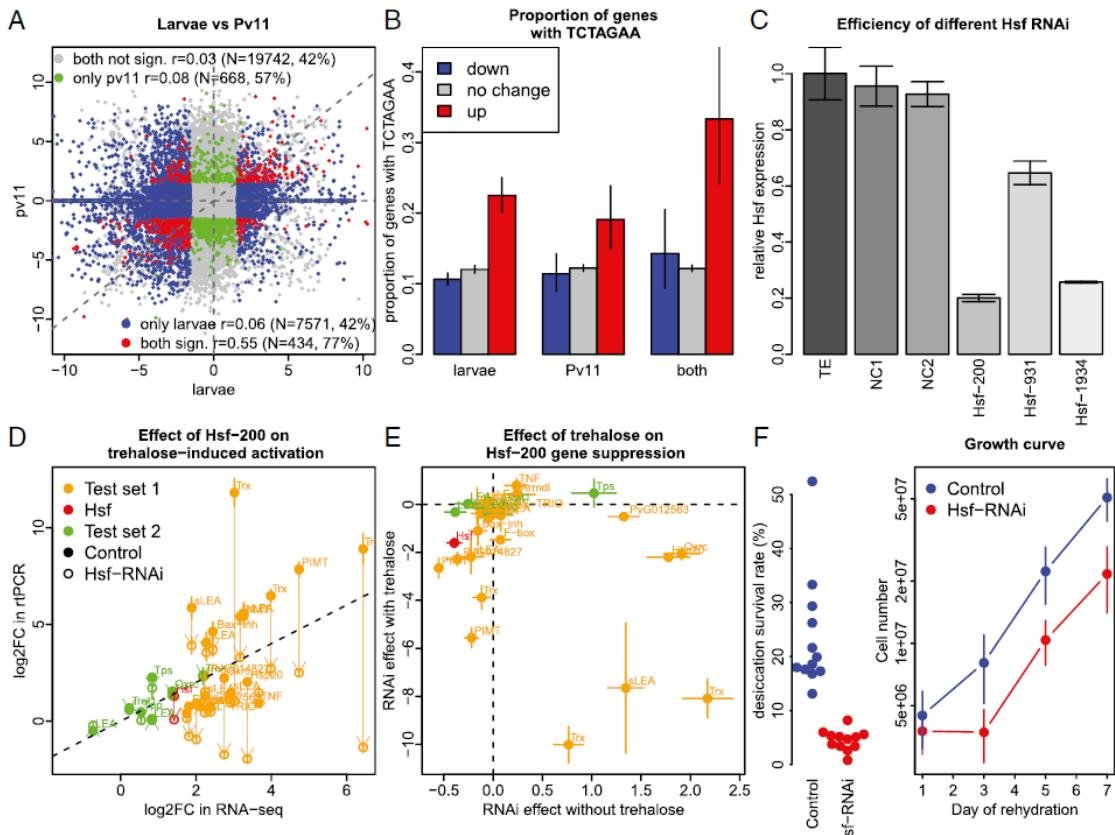


Рисунок 33 – Роль Hsf в регуляции десикационно-активируемых генов в клеточной модели Pv11 при обработке трегалозой. А) Сравнение транскрипционных изменений (\log_2 fold change) у личинок *P. vanderplanki* после 48 ч десикации и у клеток Pv11 после 48 ч трегалозной прекондиции. Цвета: серый — без значимых изменений; зелёный — активированы только у личинок; синий — только в Pv11; красный — в обеих моделях. В) Доля генов с HSF-связывающим мотивом TCTAGAA в промоторах среди транскриптов со стабильной (серый), сниженной (синий) и повышенной (красный) экспрессией. С) Уровни мРНК Hsf в клетках Pv11 после трансфекций: фиктивной (TE), негативными контролями (Nc1, Nc2) или siRNA против Hsf (HSF-200). Д) Сопоставление изменений экспрессии в Pv11 по RNA-seq (ось X) и qPCR (ось Y): закрашенные маркеры — контроль, пустые — после сайленсинга Hsf; стрелки показывают изменения для отдельных генов. Е) Изменение экспрессии (\log_2 fold change) при сайленсинге Hsf в контроле (ось X) и при трегалозной обработке (ось Y). Цвета: оранжевый — набор генов 1; зелёный — набор 2; красный — Hsf. F) Выживаемость Pv11 после десикации и регидратации: слева — доля жизнеспособных клеток через сутки, справа — пролиферация. Сравнение клеток с контрольным siRNA и siRNA HSF-200; погрешности ± 4 SD.

Дополнительно выявлены особенности посттранскрипционного контроля самого *Hsf*. У *P. vanderplanki* в условиях обезвоживания наблюдается снижение включения 5-го экзона, кодирующего часть транскрипционного активирующего домена, что может модифицировать активность HSF-белка. У *P. nubifer* также зафиксированы альтернативные сплайсинг-события, но с иным характером: чаще наблюдается ретенция смежных инtronов, что может указывать на неполноценную регуляцию в условиях стресса. Эти наблюдения свидетельствуют о многоуровневом контроле *Hsf* в анgidробиозе, включающем как промоторную регуляцию через TCTAGAA-мотивы, так и посттранскрипционные механизмы (Рисунок 34).

В совокупности данные демонстрируют, что у *P. vanderplanki* HSF-связывающие мотивы (TCTAGAA) статистически обогащены и позиционно сфокусированы в промоторных областях десикационно-индуцируемых генов, включая ключевые эффекторные модули анgidробиоза — LEA-белки, антиоксиданты, шапероны и ферменты трегалозного метаболизма. При этом собственный промотор *Hsf* содержит tandemные HSF-сайты, что обеспечивает механизм автоиндукции и поддерживает расширенную регуляторную петлю. Такая архитектура формирует функционально интегрированный HSF-регулон, отличающий *P. vanderplanki* от чувствительного вида *P. nubifer*, и подчёркивает центральную роль HSF в координации защитного ответа при анgidробиозе (Mazin et al., 2018).

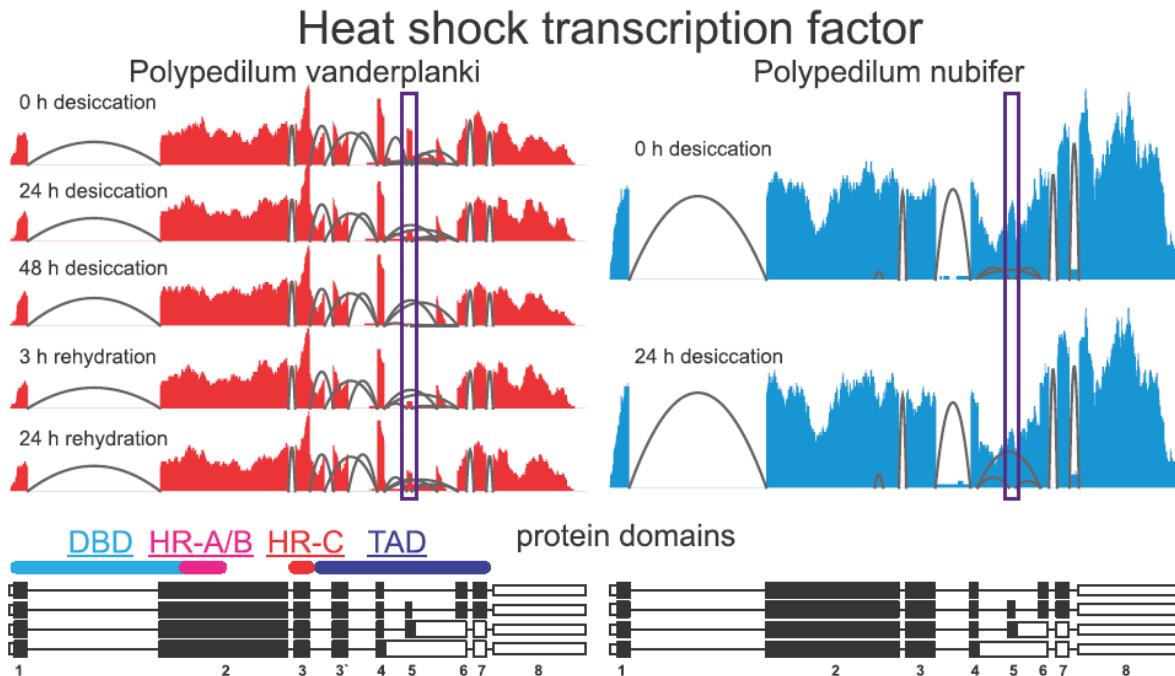


Рисунок 34 – Покрытие транскрипта Hsf по данным RNA-seq у *Polypodium vanderplanki* (набор DS1) и *P. nubifer*. В верхней части показаны графики покрытия, отражающие уровень транскрипционной активности в пределах гена. Ниже приведена структура гена Hsf: чёрные прямоугольники соответствуют кодирующими экзонам, белые — некодирующими участкам. Над структурой обозначены функциональные домены белка: ДНК-связывающий домен (DBD), гептадные повторы HR-A/B, обеспечивающие тримеризацию, ингибирующий домен HR-C и трансактивационный домен (TAD), отображённые цветными линиями. Зона пониженного покрытия 5-го экзона у *P. vanderplanki*, включающего участок TAD, выделена фиолетовым прямоугольником.

3.5.3. Функциональная роль HSF: данные, полученные на клеточной культуре Pv11

Для оценки причинной роли HSF использовалась клеточная линия Pv11, в которой предварительная обработка трегалозой индуцирует ключевые компоненты десикационного ответа. Сопоставление транскриптомных данных показало, что 14% генов, дифференциально экспрессируемых у личинок *P. vanderplanki* через 48 часов десикации,

также изменяют экспрессию в клетках Pv11 после 48-часовой инкубации с трегалозой. При этом в 77% случаев направление изменения экспрессии совпадает (тест Фишера: $P < 10^{-10}$; OR = 10,5; $\rho = 0,55$), что подтверждает релевантность клеточной модели для функционального анализа вклада HSF. Все эксперименты проводились в трёх независимых биологических повторах.

Для таргетной валидации был сформирован тестовый пул из 29 генов, включая *Hsf*, с обогащением по наличию промоторного мотива TCTAGAA. Сконструированы три siRNA, направленные против *Hsf*, две из которых обеспечили снижение экспрессии данного транскрипта на ~80%. Для последующих экспериментов использовалась наиболее эффективная конструкция — HSF-200.

На фоне подавления *Hsf* активация предсказанных мишеней HSF в ответ на трегалозную обработку оказалась статистически значимо ослабленной. Из 21 гена с верифицированной десикационно-индуцируемой активацией, у 18 наблюдалась достоверные различия в экспрессии между клетками, обработанными HSF-200, и негативными контролями после инкубации с трегалозой (t-тест, поправка Бенджамини–Хохберга, $P < 0,05$). В 16 случаях экспрессия была снижена (биномиальный тест, $P < 0,002$), что подтверждает функциональный вклад HSF в транскрипционную активацию защитных генов, включая *LEA* и компоненты трегалозного метаболизма.

Ключевым фенотипическим проявлением явилось резкое снижение выживаемости: после десикации и регидратации доля жизнеспособных клеток Pv11 с нокдауном *Hsf* была в пять раз ниже по сравнению с контролем (критерий Манна–Уитни, $P < 10^{-6}$). В то же время средняя скорость пролиферации в последующие дни достоверно не отличалась от контрольной группы (ANOVA, $P = 0,3$), а наблюдаемое замедление на 1–3 сутки, по-видимому, отражает последствия высокой ранней летальности RNAi-обработанных клеток.

Таким образом, модель Pv11 подтвердила причинно-следственную роль *Hsf* в формировании десикационной устойчивости. Его нокдаун приводит к подавлению трегалозо-индуцируемой транскрипционной активации ключевых защитных программ и к резкому снижению клеточной выживаемости после обезвоживания. Эти результаты согласуются с гипотезой о центральной роли HSF в архитектуре десикационного ответа у *Polypodium vanderplanki* (Mazin et al., 2018).

3.5.4. Заключение к разделу

Совокупный анализ полученных данных позволяет заключить, что ангидробиоз у *Polypodium vanderplanki* реализуется как HSF-центричная регуляторная программа, в рамках которой ранняя транскрипционная активация гена *Hsf* запускает модулярную координацию защитных путей, определяющих физиологическое состояние клетки в процессе обезвоживания и последующей регидратации.

Данный вывод обоснован тремя независимыми, но взаимодополняющими линиями доказательств:

- 1. Временная организация транскрипционного ответа.**

Индукция *Hsf* происходит на ранних этапах обезвоживания и предшествует фазовой активации шаперонных систем, включая *Hsp70* и *Hsp60*, которые демонстрируют «двухволновую» экспрессионную динамику с пиками на поздней десикации и в начале регидратации. Такая хронология указывает на directiveную роль *Hsf* в формировании позднего защитного ответа.

- 2. Регуляторная архитектура промоторов.**

Обнаружено статистически значимое обогащение HSF-связывающих мотивов (TCTAGAA) в промоторных областях генов, индуцируемых в ответ на десикацию, включая *LEA*, тиоредоксины и ферменты трегалозного метаболизма. Более того, в промоторе самого *Hsf* у *P. vanderplanki*

выявлены дублированные TCTAGAA-сайты с уникальной позиционной конфигурацией, что указывает на наличие автокаталитического регуляторного контура, стабилизирующего экспрессию *Hsf*.

3. Функциональная валидация причинно-следственной связи.

РНК-интерференция в клеточной модели Pv11 показала, что нокдаун *Hsf* приводит к подавлению трегалозо-индуцируемой транскрипционной программы и к пятикратному снижению выживаемости клеток после высушивания. Эти данные функционально подтверждают центральную роль HSF в запуске ключевых защитных механизмов, ассоциированных с десикационной устойчивостью.

Межвидовой сравнительный анализ с близкородственным видом *P. nubifer*, не обладающим ангидробиозной толерантностью, демонстрирует, что критическим фактором устойчивости выступает не наличие самих «тепловых» генов, а промоторная переорганизация и усиленная HSF-связанность. У *P. vanderplanki* наблюдается высокая плотность HSF-мотивов в функциональных регуляторных регионах и скоординированная архитектура транскрипционных блоков, тогда как у *P. nubifer* отсутствует интегрированный регуляторный ответ, несмотря на наличие гомологичных генов.

Таким образом, HSF у *P. vanderplanki* функционирует не как вторичный маркер клеточного стресса, а как системообразующий регулятор, координирующий активацию протеостатических, антиоксидантных и сахаро-метаболических модулей. Это обеспечивает как переход в стекловидное, метаболически приостановленное состояние, так и безопасное возвращение к активному метаболизму. Выраженная индукция шаперонов (до 3–5-кратного повышения уровня экспрессии *hsp*) представляет собой лишь наиболее яркий фенотипический маркер глубокой перестройки, лежащей в основе ангидробиотической устойчивости *P. vanderplanki*.

3.6. Метаболический перезапуск при ангидробиозе и трегалозный резерв

Одним из ключевых вопросов ангидробиоза является понимание того, какие метаболические механизмы обеспечивают переносимость обезвоживания и безопасный запуск метаболизма после поступления воды. С целью реконструкции этих процессов мы выполнили количественное профилирование метаболома на трёх ключевых стадиях — начале десикации (D0), завершении сухой фазы (D48) и ранней регидратации (R3), дополнительно сопоставив эти данные с экспрессией генов, кодирующих основные ферментативные узлы. Такой подход позволил не просто зафиксировать изменения, но и восстановить их последовательность — от подготовки субстратов в сухой фазе до их направленного расходования при реактивации. В анализ вошли 266 метаболитов, что дало возможность проследить перестройку углеводного, энергетического и азотного обмена и выделить ведущие механизмы устойчивости: 1) резерв трегалозы как источник энергии ранней регидратации; 2) «энергетическое праймирование» - предварительная настройка энергетического обмена в сухой фазе, обеспечивающая быстрый и контролируемый запуск окислительного катаболизма при регидратации митохондрий и 3) альтернативные неглутационовые контуры антиоксидантной защиты. На уровне углеводного обмена выявлен направленный сдвиг в сторону трегалозы: в фазе D48 регистрируется многократное повышение уровня её предшественника (тргалозо-6-фосфата, Т6Р), при одновременном снижении гликолитических интермедиаторов (G6Р, уридинифосфат) и транскрипционной индукции ферментов TPS/TPP и транспортёра TRET1 (Рисунок 35).

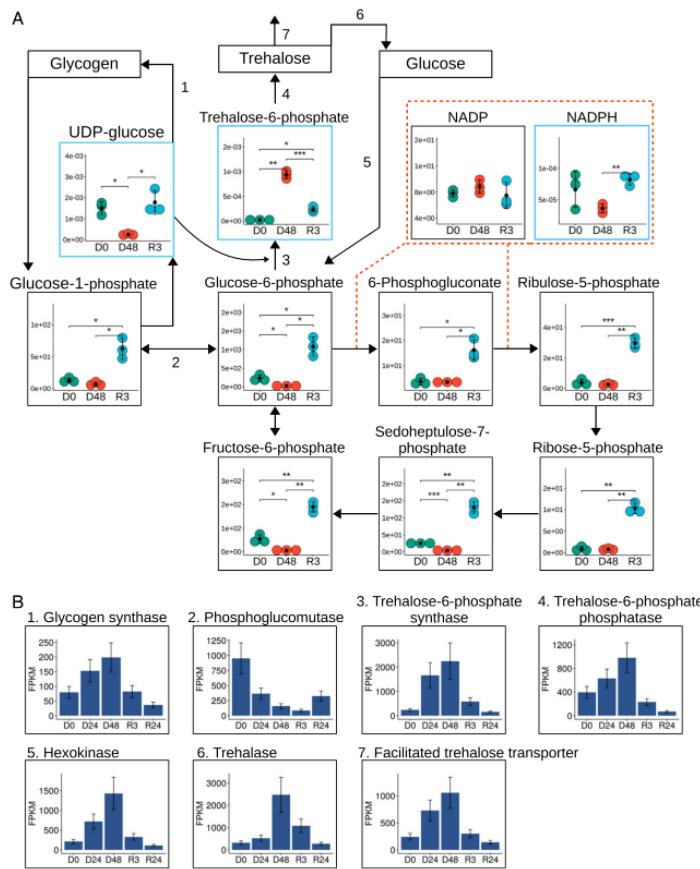


Рисунок 35 – Изменения углеводного обмена при цикле десикация–регидратация у *P. vanderplanki*.

А) Метаболомные и транскриптомные изменения: динамика метаболитов представлена точечными диаграммами. Временные точки: D0 (зелёный), D48 (красный), R3 (синий); средние значения трёх повторов показаны чёрными точками, планки — SD. Уровень значимости обозначен звёздочками ($* < 0,05$; $** < 0,01$; $*** < 0,001$). По оси Y для панелей в синих рамках указана относительная концентрация (по площадям пиков), в чёрных рамках — абсолютное содержание (пмоль на особь). Ферменты и транспортеры обозначены цифрами: 1 — синтаза гликогена; 2 — фосфоглюкомутаза; 3 — синтаза T6P; 4 — фосфатаза T6P; 5 — гексокиназа; 6 — трегалаза; 7 — транспортер трегалозы TRET1.

Б) Экспрессия этих ферментов и транспортеров по данным транскриптомного анализа на 0, 24 и 48 ч десикации (D0, D24, D48) и через 3 и 24 ч после регидратации (R3, R24).

Одновременно к концу десикации отмечался резкий подъем экспрессии трегалазы, что обеспечивает быстрый катаболизм трегалозы в начале регидратации. Частичное восстановление гликогена регистрируется к 16-му часу после начала регидратации и вместе с тем, суммарный углеводный пул сокращается по мере повторных циклов дегидратация/регидратация (Рисунок 36).

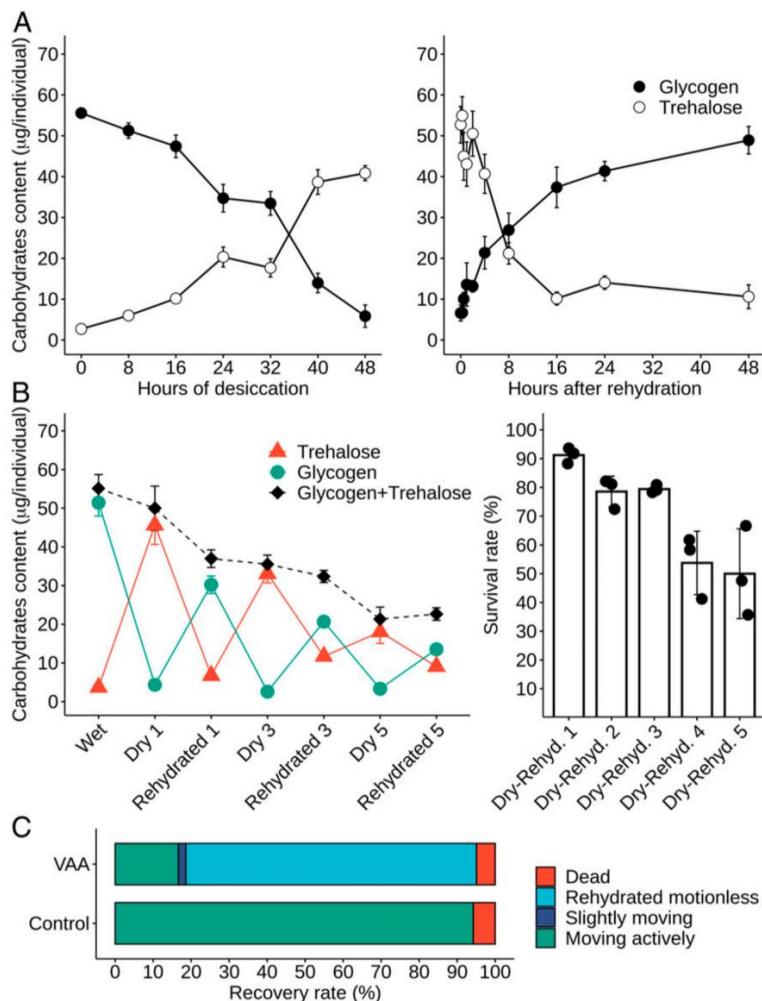


Рисунок 36 – Динамика углеводов и выживаемость личинок *P. vanderplanki* при десикации. А) Изменение уровней основных углеводов при десикации (слева) и регидратации (справа). Трегалоза показана пустыми кружками, гликоген — закрашенными. Значения приведены как средние для 8–15 особей, планки погрешностей — SEM. График слева адаптирован из источника 15. В) Влияние повторных циклов десикация–регидратация на углеводы и выживаемость. Слева: уровни углеводов у гидратированных личинок после циклов десикации (Dry 1, 3, 5) и регидратации (Rehydrated 1, 3, 5). Трегалоза — красные треугольники, гликоген — зелёные кружки, суммарные углеводы — чёрные ромбы и штриховая линия. Данные — средние для 14–17 особей, погрешности — SEM. Справа: доля выживших личинок после 1–5 циклов; столбцы — средние трёх экспериментов, погрешности — SD. С) Влияние ингибиции трегалазы на выживаемость через 16 ч после регидратации. Личинкам вводили воду (контроль) или ингибитор трегалазы (VAA) перед десикацией и регидратацией; жизнеспособные личинки активно двигались, тогда как нежизнеспособные были слабо подвижны или неподвижны.

Дальнейший анализ показал, что в начальной фазе регидратации углерод, высвобождающийся из трегалозы и гликогена, преимущественно утилизируется в пентозофосфатном пути для генерации НАДФН и поддержания окислительно-восстановительного баланса. По мере регидратации усиливаются гликолиз и последующий вход метаболитов в цикл трикарбоновых кислот (ЦТК). В сухом состоянии концентрации большинства интермедиатов ЦТК снижены, при этом повышен уровень цитрата и цис-аконитата. В фазе R3, напротив, возрастает содержание пирувата и лактата, отмечается подъём транскриптов АТФ-цитратлиазы (ACLY), формирующей ацетил-КоА для пластических и регуляторных процессов. К ориентировочно R12 уровни интермедиатов ЦТК приближаются к контрольным показателям. Параллельно при десикации нами зафиксирован сдвиг аденилатного пула в сторону низкоэнергетических форм (рост АМФ/АДФ при снижении АТФ/ЦТФ/ГТФ) с сохранением аденилатного энергетического заряда порядка 0,6. Важно, что значимая доля АТР удерживается до поздних этапов высушивания, а дыхательная активность регистрируется и оперативно восстанавливается в первый час регидратации (Рисунок 37).

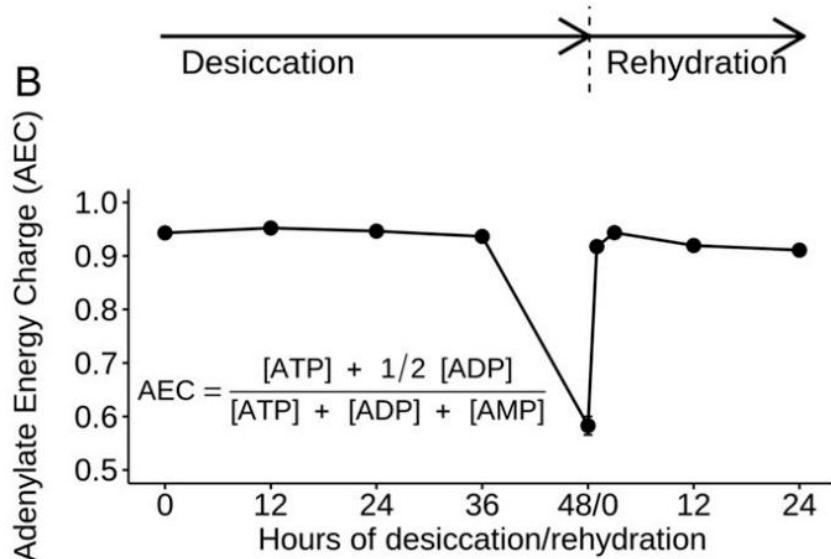


Рисунок 37 – Аденилатный энергетический заряд (AEC) в ходе десикации и последующей регидратации. Стандартное отклонение (SD) показано для образцов D0 и D48/R0, полученных в дупликах.

В отношении азотного обмена мы выявили накопление мочевой кислоты, аллантоина и аллантоевой кислоты в сухом состоянии; вместе с тем, существенный рост мочевины преимущественно приходится на период к R12, что согласуется с восстановлением экскреторной функции. Для чувствительного вида *P. nubifer* отмечается иная стратегия — раннее повышение уровня мочевины уже при десикации, что контрастирует с характерными для *P. vanderplanki* сценариями адаптации. В рамках антиоксидантной защиты ранняя регидратация сопровождается повышением предшественников глутамина и устойчивым ростом неглутационовых метаболитов: офтальминовой кислоты (в D и ранней R фазах) и γ -глу-2-аминобутират, обнаруживаемого в фазах D/ранней R и рассматриваемого нами как предшественник офтальминовой кислоты. Наконец, в триптофановом (кинуруниновом) пути мы не наблюдали накопления реакционно-активного 3-гидроксикинурунина. Вместо этого возрастают ксантуреновая кислота как химически стабильный продукт его детоксикации. В подтверждение такого распределения потоков нами

идентифицированы два tandemных ортолога аминотрансферазы 3-гидроксикинурунина (HKT), локализованные в ARId-островах и транскрипционно индуцируемые десикацией при низком уровне экспрессии KAT (Рисунок 38).

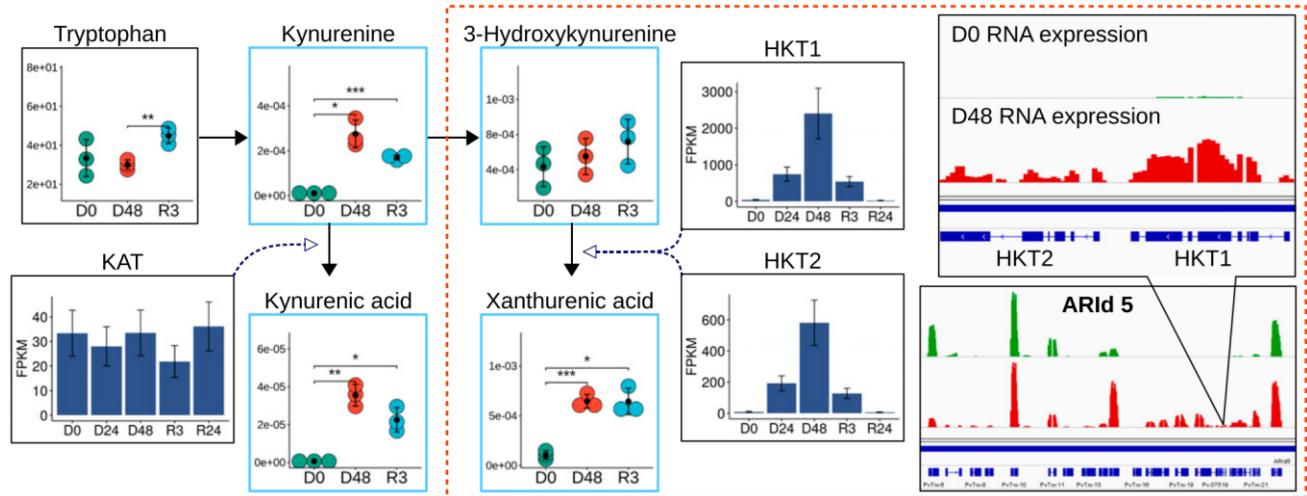


Рисунок 38 – Кинуруниновый путь (KYN) и профили экспрессии связанных ферментов. Блоки справа показывают локализацию предполагаемых генов HKT в острове генов, связанном с анхидробиозом, № 5 (ARId 5); зелёные и красные точки обозначают покрытие RNA-seq в моменты D0 и D48 соответственно. Звёздочки обозначают уровень значимости ($*<0,05$; $**<0,01$; $***<0,001$). Профили экспрессии ферментов получены по данным транскриптомного анализа на 0-м, 24-м и 48-м часах десикации (D0, D24, D48) и через 3 и 24 ч после регидратации (R3, R24).

3.6.1. Заключение к разделу

Полученные нами результаты расширяют представления о молекулярной природе ангидробиоза за счёт целостной интеграции метаболомных и транскриптомных данных, позволяя реконструировать поэтапную организацию регидратации. В частности установлено, что трегалоза у *P. vanderplanki* выполняет двойную функцию: уже известную — структурную (витрификация в сухом состоянии) и энергетическую — как заранее сформированный «быстрый» резерв топлива для запуска восстановительных процессов (Рисунок 39).

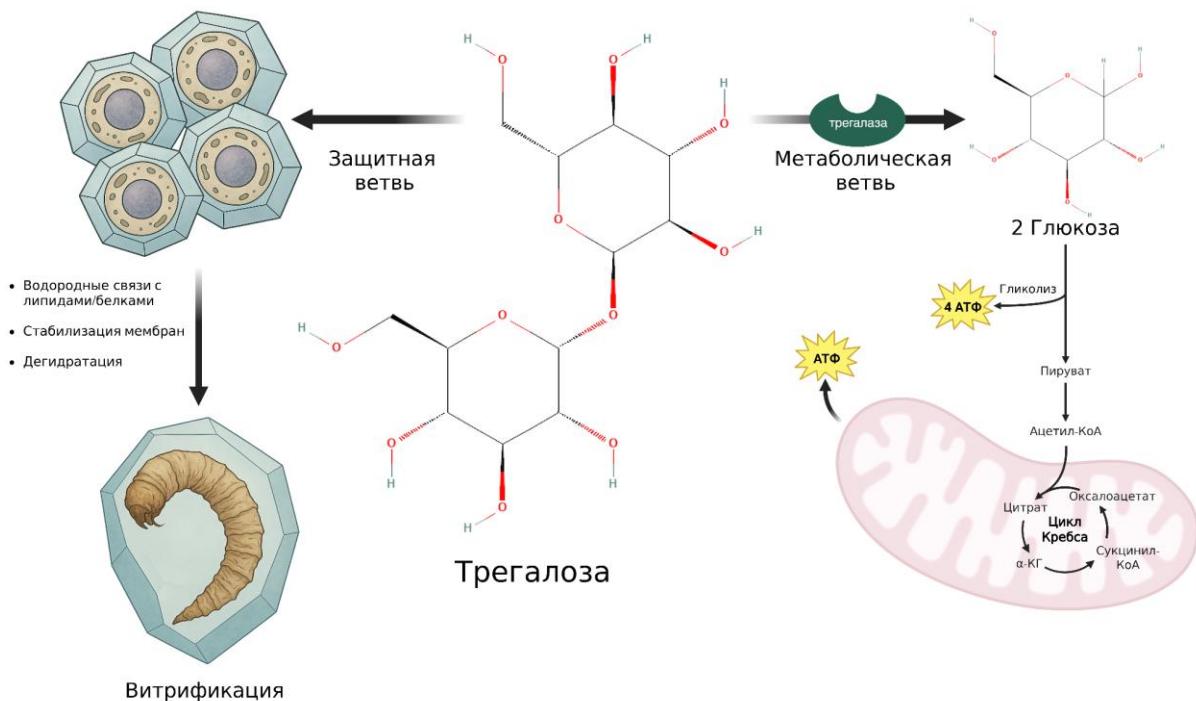


Рисунок 39 – Роль трегалозы в защите клеток и обеспечении энергетического обмена.

Такой функциональной интерпретации соответствует направленное усиление биосинтеза и транспорта трегалозы при десикации, предреактивационный подъём трегалазы и ранний отток углерода в пентозофосфатный путь с последующим подключением гликолиза, ЦТК и ацетил-КоА-зависимых реакций (в том числе при участии АТФ-цитратлиазы). Дополнительно выявлено метаболическое «праймирование» mitochondrialного катаболизма в сухом состоянии (повышение цитрата при смещении аденилатного баланса и $AEC \approx 0,6$ при сохраняющем пуле АТР), что обеспечивает контролируемый и быстрый переход к аэробному метаболизму в ранней регидратации. Наконец, наряду с классической глутатионовой системой, мы констатируем существование функционально значимой неглутатионовой антиоксидантной подсистемы, включающей офтальминовую кислоту и её вероятный предшественник γ -глу-2-аминобутират, а также специализированную детоксикацию 3-

гидроксикинурунина по маршруту к ксантуреновой кислоте при участии НКТ. Таким образом, двухконтурная модель поддержания окислительно-восстановительного баланса в сочетании с безопасной утилизацией азота минимизирует риск оксидативного и азотного стресса в критический период перехода из «сухого состояния» в «активный метаболизм», что, по-видимому, предопределяет межвидовые различия устойчивости и определяет перспективные мишени для последующей функциональной валидации.

3.7. Биотехнологический потенциал клеточной линии Pv11: сухое хранение ферментов, промоторные системы и геномное редактирование для ангиробиоза

Клеточная линия *Polypedilum vanderplanki* Pv11 представляет собой уникальную экспериментальную платформу, сочетающую в себе свойства эукариотической клеточной системы и устойчивость к экстремальной десикации. Благодаря сохранению способности к ангиробиозу *in vitro*, эти клетки открывают принципиально новые возможности для биотехнологического применения, ранее недоступные стандартным линиям млекопитающих или насекомых (Sogame et al., 2017; Tokumoto et al., 2021; Tanaka et al., 2022).

3.7.1. Доказательство принципа «сухого» хранения биоактивных белков на Pv11

Проведена оценка сохранности ферментативной активности белков после индукции ангиробиоза, полного высушивания, хранения в сухом состоянии при комнатной температуре и последующей регидратации. В качестве модельного объекта использован биологически активный фермент люцифераза (Luc), позволяющий количественно регистрировать

катализическую активность по уровню биолюминесценции (Kikuta et al., 2017).

Установлено, что после цикла «высушивание—регистрация» активность Luc сохраняется на статистически значимом уровне и поддаётся воспроизводимому измерению. На временном ряде показано, что снижение суммарной интенсивности свечения соответствует уменьшению доли жизнеспособных клеток, тогда как удельная (в пересчёте на живую клетку) активность Luc остаётся сопоставимой с уровнем до высушивания (Рисунок 40). Показано, что предварительная трегалозная индукция является необходимым условием сохранения ферментативной функции: при её отсутствии наблюдается резкое снижение как выживаемости, так и сигналов Luc после регистраций; напротив, прединдукция обеспечивает воспроизводимое восстановление активности до уровней, сопоставимых с «мокрым» контролем (Рисунок 40) (Kikuta et al., 2017; Mizutani et al., 2024; Yamada et al., 2018).

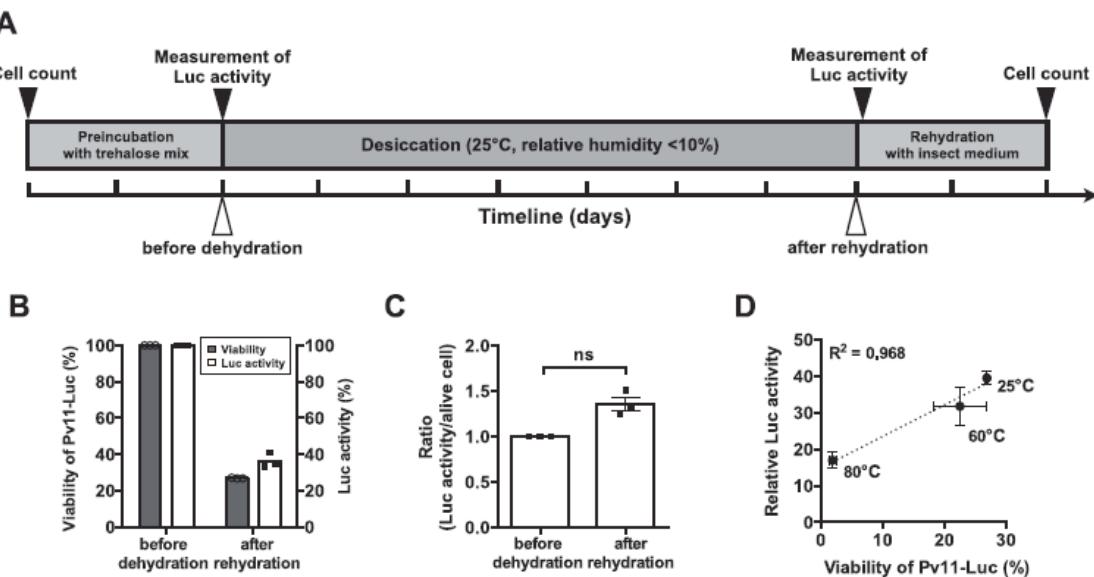


Рисунок 40 – А) Схематическая временная шкала, отображающая моменты проведения обработок (белые стрелки) и измерений (чёрные стрелки). Основные деления соответствуют одному дню. Полная дегидратация клеток Pv11 наступает приблизительно через 30 ч от начала процесса. Процент люминесцентной интенсивности Luc и количество клеток определялись до этапа обезвоживания (после прединкубации в смеси, содержащей 600 мМ трегалозы, 10% IPL-41 и 1% FBS). Интенсивность свечения, индуцированного люциферазой, измерялась через 1 ч после регидратации. Жизнеспособность клеток Pv11-Luc оценивалась с использованием теста WST-8. В) Жизнеспособность клеток Pv11-Luc (серые столбцы) и процент активности Luc (белые столбцы), представленные в виде диаграммы рассеяния ($n = 3$). Ошибки указаны как стандартная ошибка среднего. С) Активность Luc в выживших клетках представлена как отношение люциферазной активности к числу клеток. Количество выживших клеток определялось колориметрическим методом WST-8 до обезвоживания и после регидратации. В данном анализе «до обезвоживания» означает до прединкубация в смеси с трегалозой, а «после регидратации» — через 2 дня после регидратации в среде для насекомых. Количество выживших клеток также определялось методом окрашивания кальцеином после прединкубации в трегалозе и через 1 ч после регидратации. Статистическая значимость оценивалась с использованием критерия Манна—Уитни ($p = 0,064$). (Д) Влияние теплового стресса. Высушенные образцы подвергались нагреванию в течение 5 мин при 60 и 80 °C перед регидратацией. Образцы, выдержаные при 25 °C, использовались в качестве контроля без стресса.

При длительном «сухом» хранении ферментативная активность сохраняется и продолжает регистрироваться даже на максимальном сроке наблюдения (372 сутки). Несмотря на общее снижение выживаемости, биолюминесцентный сигнал от оставшейся популяции клеток остаётся отчётливо детектируемым (Рисунок 40). Температурная нагрузка на высушенные клетки оказывает дозозависимое влияние: кратковременное повышение температуры до 60–80 °C приводит к согласованному снижению как жизнеспособности, так и активности Luc по сравнению с условиями комнатной температуры (Рисунок 41). Эта зависимость интерпретируется как следствие выхода стеклообразной матрицы трегалозы за пределы температуры витрификации, приводящего к ослаблению защитного эффекта. С использованием фармакологического контроля показано, что восстановление сигнала после регидратации обусловлено сохранением уже существующих активных молекул фермента, а не их быстрым ресинтезом *de novo*: даже в присутствии ингибиторов трансляции (циклохексимида и эмитина) активность остаётся детектируемой. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о сохранении каталитически активного состояния белка при «сухом» хранении внутри клетки (Kikuta et al., 2017).

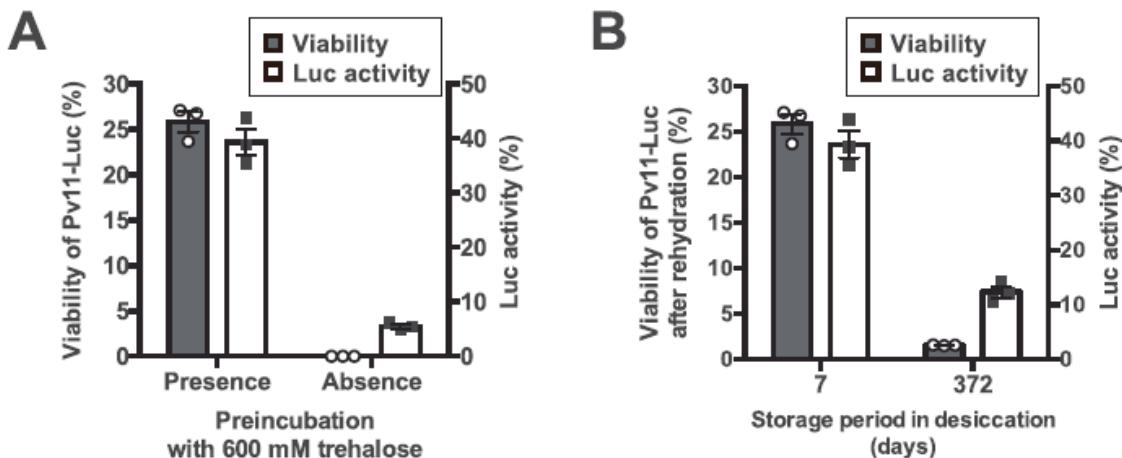


Рисунок 41 – Влияние сроков хранения на выживаемость клеток Pv11-Luc после обезвоживания. Жизнеспособность обезвоженных клеток Pv11-Luc (серые столбцы) и соответствующая относительная активность Luc (белые столбцы) после регидратации представлены в виде диаграммы рассеяния ($n = 3$). Ошибки указаны как стандартная ошибка среднего. А) Влияние прединкубации с трегалозой на выживаемость клеток и активность Luc. Оценка проводилась после регидратации; данные представлены в виде диаграммы рассеяния. В) Длительное хранение обезвоженных клеток Pv11-Luc после прединкубации с трегалозой. Клетки хранились в десикаторе в течение 7 и 372 суток.

Полученные данные согласуются с восстановлением функционального состояния клеток Pv11 после регидратации по независимым показателям жизнеспособности и морфологии, что косвенно свидетельствует о сохранении внутриклеточной среды, достаточной для работы белковых систем. Применимость подхода к ферментам прикладного значения подтверждена на модели каталитически активной обратной транскриптазы AMV RT α при управляемой (индуцируемой) экспрессии, что расширяет спектр потенциальных «бионагрузок» для последующего «сухого» хранения и функционального восстановления (Kikuta et al., 2017; Tokumoto et al., 2020).

В совокупности результаты свидетельствуют о принципиальной осуществимости «сухого» хранения биоактивных ферментов в клетках

Pv11 при условии трегалозной прединдукции и контролируемой температурной нагрузки. Показано сохранение измеримой активности модельного фермента после регидратации, включая длительные сроки хранения (Kikuta et al., 2017).

3.7.2. Промоторная архитектура *Pv11* для высокоуровневой и кросс-линейной экспрессии (промотор 121/*Pv.00443*)

Для успешной реализации биотехнологических приложений на клеточной платформе *Pv11* необходима воспроизводимая и высокоэффективная система экспрессии экзогенных генов, сохраняющая функциональность как в стандартных условиях культивирования, так и в состоянии ангидробиоза. В настоящем разделе представлены результаты идентификации и функциональной валидации сильного эндогенного промотора 121, локализованного в генетическом окружении гена *Pv.00443*. Кроме того, охарактеризованы укороченные варианты данного промотора, обеспечивающие возможность тонкой регуляции уровня транскрипции. Продемонстрирована переносимость этой промоторной архитектуры на другие клеточные линии насекомого происхождения, а также её пригодность для получения стабильных трансформантов.

Для создания конститутивной экспрессирующей системы в клетках *Pv11* был выделен сильный эндогенный промотор из области, прилегающей к гену *Pv.00443*. На основе транскриптомных данных (база данных MidgeBase) был клонирован геномный фрагмент длиной 1 842 п.н., охватывающий предполагаемую зону инициации транскрипции. С помощью серии последовательных делеций установлено, что укороченный вариант длиной –1 333 п.н. сохраняет максимальную промоторную активность и далее рассматривается как промотор 121 (Рисунок 42).

По данным люциферазного анализа, относительная активность полного фрагмента составила $5\ 175 \pm 1\ 260$ RLA. При укорочении до 963 п.н. активность снижалась приблизительно на 50 % ($2\ 491 \pm 729$ RLA), а при дальнейшем сокращении до 632 п.н. — до 25 % от исходной ($1\ 293 \pm 465$ RLA). Эти данные позволили сформировать линейку промоторов с градуированной активностью, подходящую для прецизионной настройки уровня транскрипции. Все значения нормированы по активности репортера SEAP и представлены в формате среднее ± стандартное отклонение ($n = 3–6$).

Сравнительный анализ с ранее использовавшимися промоторами показал, что в клетках *Pv11* транскрипционная активность промотора 121 статистически значимо превышает активность таких конструкций, как *PvGapdh*, *OpIE2*, *BmA3* и *Bmhsp90P2.9* (Рисунок 42) (Miyata et al., 2019).

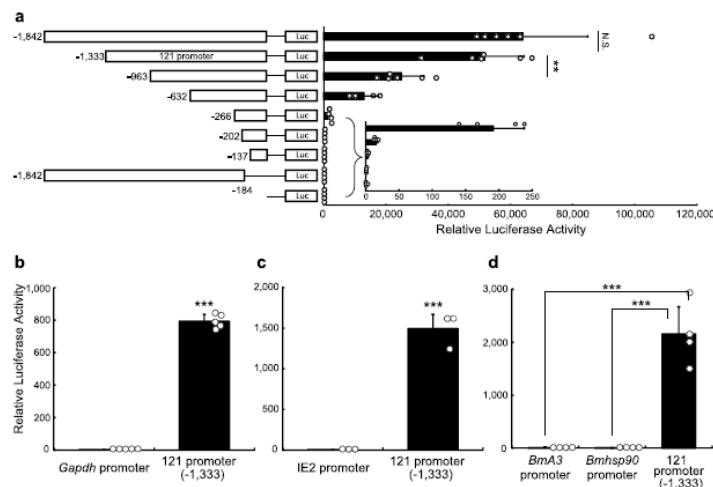


Рисунок 42 — Транскрипционная активность промотора 121 в клетках ***Pv11***.

A) Слева — схема люциферазных конструкций с различными фрагментами промотора гена ***Pv.00443***, справа — их относительная транскрипционная активность.

B–D) Сравнение активности промотора 121 (−1333 п.н.) с промоторами ***PvGapdh*** (B), ***OpIE2*** (C), ***BmA3*** и ***Bmhsp90*** (D) в клетках *Pv11*. Данные приведены как среднее ± **SD**; **p < 0,01**, ***p < 0,001**, **N.S.** — различия незначимы; *n* = 3–6 для каждой группы.

Консервация транскрипционной активности промотора 121 была оценена в ряде клеточных линий насекомых, представляющих различные филогенетические клады: *S2* (*Drosophila melanogaster*), *SaPe-4* (*Sarcophaga peregrina*), *AeAl-2* (*Aedes albopictus*), *Sf9* (*Spodoptera frugiperda*), *BmN4* (*Bombyx mori*) и *Tc81* (*Tribolium castaneum*). Во всех протестированных линиях была зафиксирована отчётливая промоторная активность конструкции 121, что свидетельствует о её функциональной устойчивости в различных клеточных контекстах (Рисунок 43). Сравнительный анализ с промотором *OpIE2* выявил выраженные видоспецифические различия: в линиях *SaPe-4* и *Pv11* промотор 121 демонстрировал существенно более высокую активность, в *S2* и *Sf9* его активность была сопоставима с *OpIE2*, тогда как в *AeAl-2* последний обеспечивал более высокий уровень транскрипции (Рисунок 43). Дополнительное сравнение с лепидоптерными промоторами *BmA3* и *Bmhsp90P2.9* показало, что в линиях *SaPe-4* и *S2* промотор 121 обеспечивал значительно более высокую транскрипционную активность, в то время как в *Sf9* наблюдалось умеренное преимущество. В линии *BmN4* статистически значимых различий между конструкциями выявлено не было (Рисунок 44) (Miyata et al., 2019).

Таким образом, полученные данные указывают на широкую применимость промотора 121 для гетерологичной экспрессии в клетках насекомого происхождения, особенно в диптераных линиях, филогенетически близких к *Polypedilum vanderplanki*. Эта универсальность делает промотор 121 перспективным элементом для построения экспрессионных систем в широком диапазоне биотехнологических приложений.

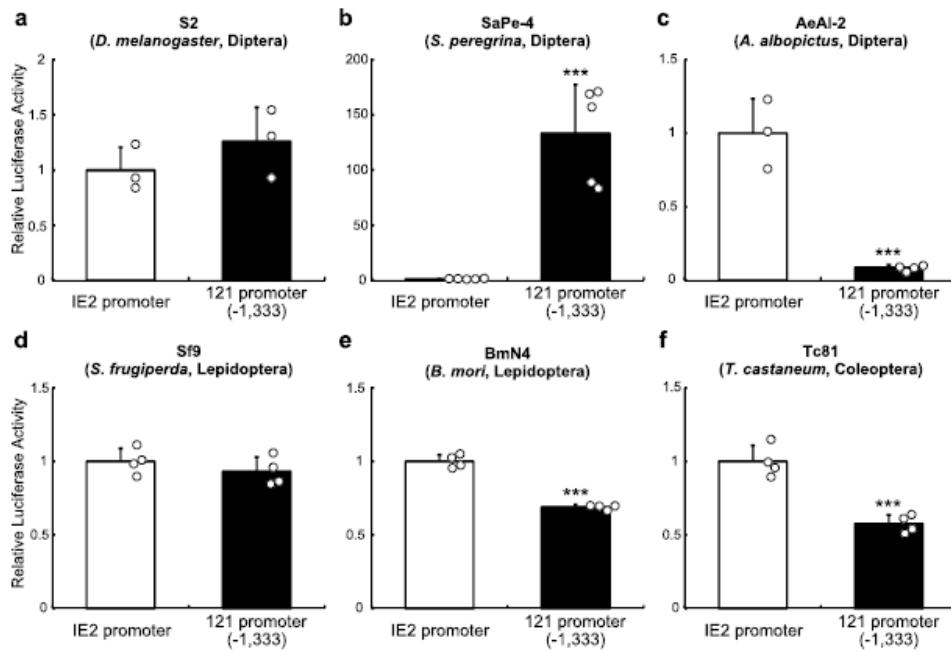


Рисунок 43 – Транскрипционная активность промотора 121 в различных клеточных линиях насекомых. Промотор OpIE2 (вируса baculovirus) и промотор 121 (−1 333 п.н.) были клонированы перед геном люциферазы, после чего соответствующие плазмидные конструкции транфецировали в различные клеточные линии: S2 A), SaPe-4; B), AeAl-2; C), Sf9; D), BmN4; E) и Tc81; F). Через 48 часов после трансфекции измеряли активность люциферазы, нормированную на уровень активности секретируемой эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP). Результаты представлены как среднее ± стандартное отклонение (SD); ***p < 0,001; n = 3–5 в каждой группе.

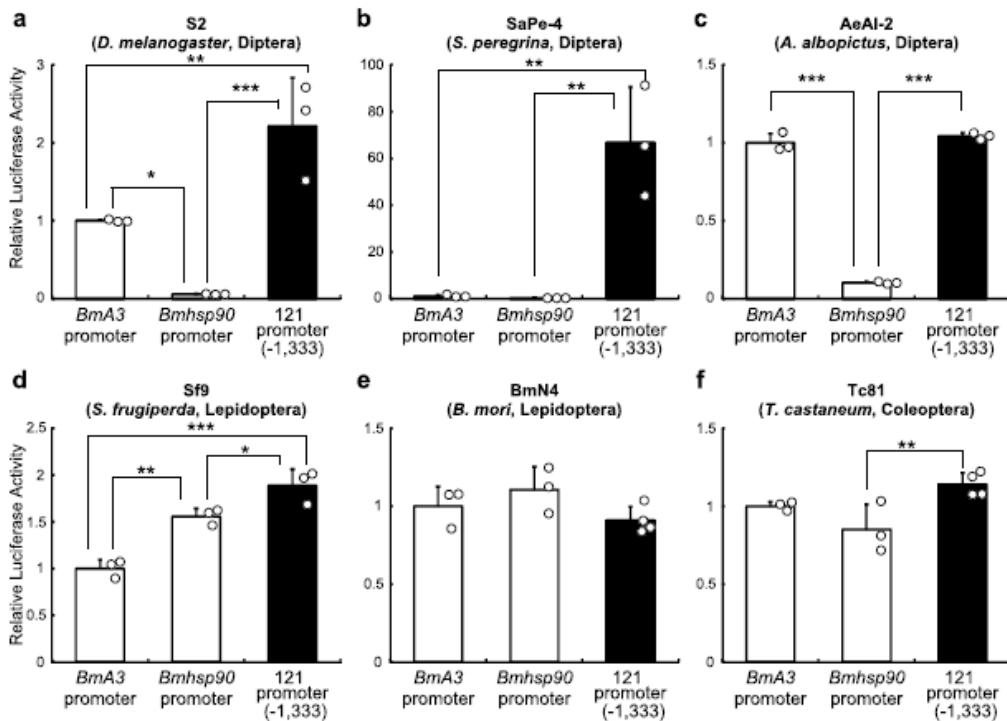


Рисунок 44 – Сравнение транскрипционной активности промотора 121 с сильными лепидоптерными промоторами BmA3 и Bmhsp90. Промоторы BmA3, Bmhsp90 (*Bombyx mori*) и промотор 121 (-1 333 п.н.) были клонированы перед геном люциферазы, после чего полученные конструкции использованы для трансфекции клеточных линий: S2 A) SaPe-4; B) AeAl-2; C), Sf9 D) BmN4; E) Tc81. F) Измерения люциферазной активности проводились через 48 часов после трансфекции с нормализацией по активности SEAP. Значения представлены как среднее ± стандартное отклонение (SD); *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; n = 3–4 в каждой группе.

Практическая эффективность промотора 121 была подтверждена получением стабильной экспрессии целевых генов. В клеточной линии *SaPe-4* под контролем промотора 121 успешно получены зеоцин-устойчивые клоны с высокой долей клеток, экспрессирующих AcGFP1, уже спустя три недели селекции. В то же время конструкции, в которых ген устойчивости к зеоцину находился под контролем промотора *OpIE2*, приводили к выраженной гибели клеточной популяции (Рисунок 45). В клеточной линии *S2* было протестировано девять комбинаций промоторов

для управления экспрессией генов *AcGFP1*, *Nluc* и *ZeoR*. Наиболее высокие показатели по доле *AcGFP1⁺* клеток, медиане флуоресценции (MFI) и активности нанолюциферазы были получены при использовании архитектур *IE2–121* и *121–IE2* (Рисунок 46). В клеточной линии *Sf9* архитектура *IE2–121* также обеспечила наивысшую эффективность, тогда как кассета *121–IE2* демонстрировала меньшую активность по сравнению с *IE2–IE2* и *IE2–121*. Это подчёркивает значимость точного подбора структуры экспрессионной кассеты в зависимости от специфики клеточного реципиента и желаемого уровня экспрессии.

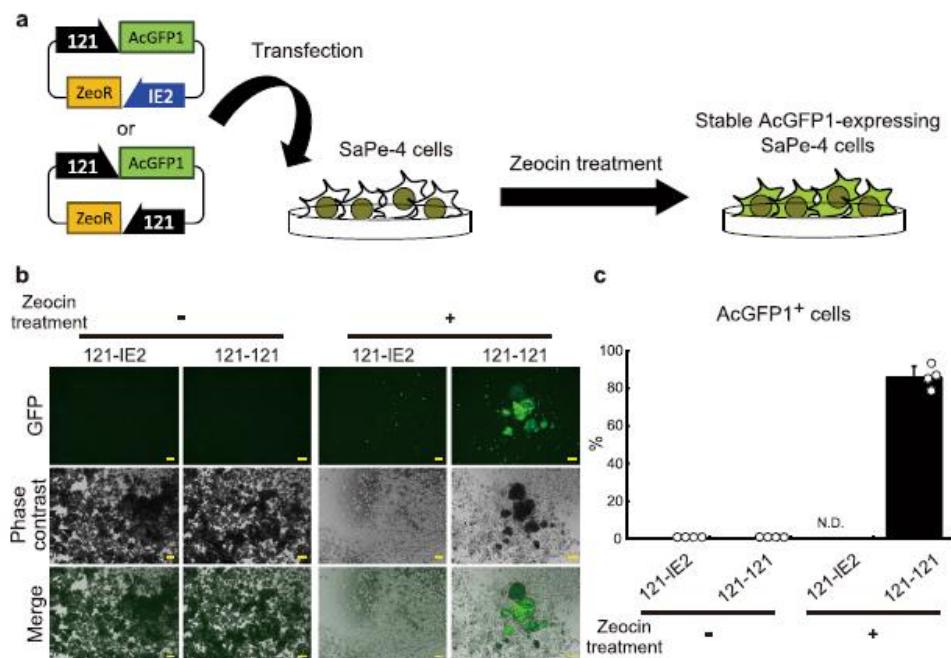


Рисунок 45 – Применение промотора 121 для стабильной экспрессии в клетках SaPe-4. А) Схема эксперимента: промотор 121 (–1333 п.н.) использовали для экспрессии *AcGFP1* и клонировали перед геном устойчивости к зеоцину (*ZeoR*); контроль — промотор OpIE2. Конструкции трансфецировали в SaPe-4 и отбирали на зеоцине. Через 3 недели получали микроскопические изображения (BZ-X700); снизу показаны объединённые кадры, слева — контроль без зеоцина (В). С) Через 3 недели долю *AcGFP1⁺* клеток в живой популяции определяли проточной цитометрией (CytoFLEX S) при культивировании с/без зеоцина. Масштаб — 200 мкм. Данные: среднее ± SD; N.D. — недостаточно клеток для анализа; n = 4 в группе.

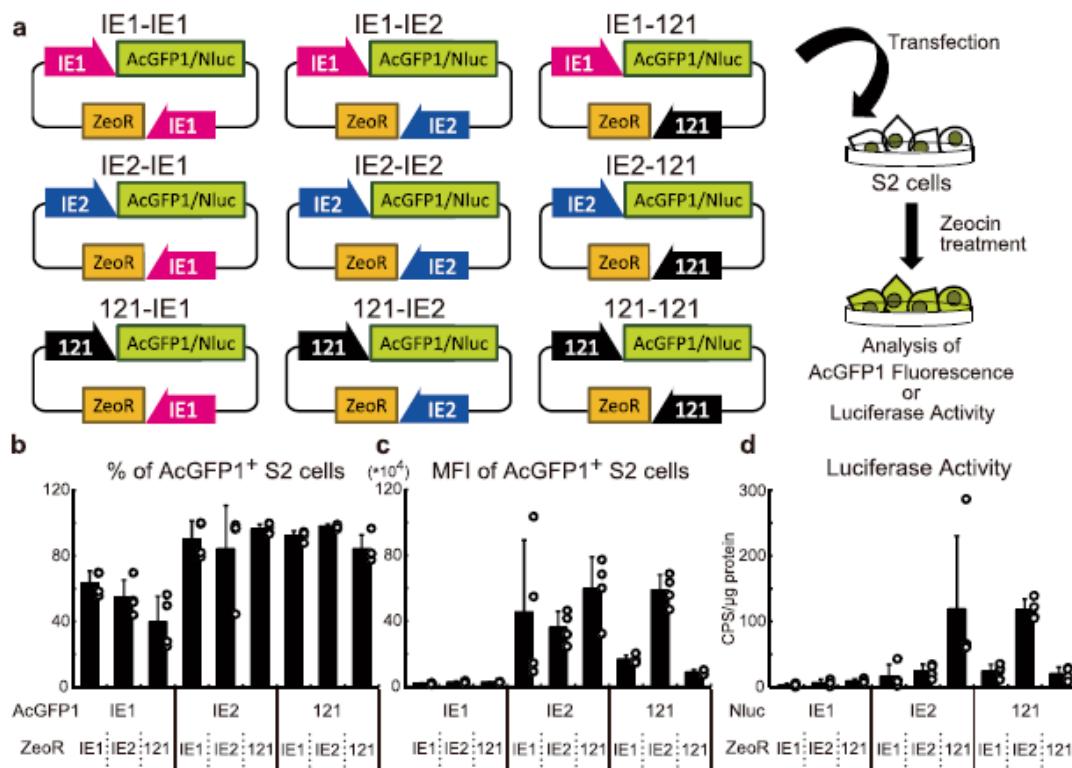


Рисунок 46 – Использование промотора 121 для создания стабильно трансфенированных клеток S2. Схема эксперимента приведена на панели (А). Девять плазмидных конструкций, направленных на экспрессию AcGFP1, Nluc и ZeoR, были трансфицированы в клетки S2. После отбора на зеоцине оценивалась экспрессия AcGFP1 по флуоресценции либо активность нанолюциферазы. В клетках, экспрессирующих AcGFP1, доля AcGFP1⁺ клеток и медианная интенсивность флуоресценции (MFI) в живой популяции анализировались методом проточной цитометрии на приборе CytoFLEX S (Б, С). В клетках, экспрессирующих Nluc, измерялась люциферазная активность (Д). Значения представлены как среднее ± стандартное отклонение (SD); n = 3–4 в каждой группе. Результаты статистического анализа приведены в таблицах 3–6.

Таблица 3 - Результаты двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) для данных, представленных на Рисунке 46 б-д.

Cell	Data Source (Dependent Variable)	Source of Variation	% of total variation	p-value
S2	Figure 5b (% of AcGFP1 ⁺ cells)	Interaction	7.777	0.0841
		AcGFP1	66.9	<0.0001
		ZeoR	2.543	0.2396
	Figure 5c (MFI of AcGFP1 ⁺ cells)	Interaction	23	0.0023
		AcGFP1	45.54	<0.0001
		ZeoR	3.182	0.237
	Figure 5d (Luciferase activity)	Interaction	37.66	0.0009
		Nluc	15.59	0.0107
		ZeoR	8.897	0.0621

Таблица 4 - Статистический анализ доли $AcGFP1^+$ клеток S2 (Рисунок 4б, б). Анализ проводился с использованием критерия Тьюки (Tukey test) в качестве пост-хок теста после двухфакторного ANOVA. $p < 0,05$ — *; $p < 0,01$ — **; $p < 0,001$ — ***; ns — различия статистически незначимы.

Таблица 5 – Статистический анализ медианной интенсивности флуоресценции (MFI) *AcGFP1⁺* клеток S2 (Рисунок 46 С). Анализ выполнен с использованием теста Тьюки после двухфакторного ANOVA. $p < 0,05$ — *; $p < 0,01$ — **; ns — различия статистически незначимы.

	IE1-IE1	IE1-IE2	IE1-121	IE2-IE1	IE2-IE2	IE2-121	121-IE1	121-IE2	121-121
IE1-IE1		ns	ns	*	ns	**	ns	**	ns
IE1-IE2	—		ns	*	ns	**	ns	**	ns
IE1-121	—	—		*	ns	*	ns	**	ns
IE2-IE1	—	—	—		ns	ns	ns	ns	ns
IE2-IE2	—	—	—	—		ns	ns	ns	ns
IE2-121	—	—	—	—	—		*	ns	**
121-IE1	—	—	—	—	—	—		*	ns
121-IE2	—	—	—	—	—	—	—		**
121-121	—	—	—	—	—	—	—	—	

Таблица 6 – Статистический анализ люциферазной активности *AcGFP1⁺* клеток S2 (Рисунок 46 D). Анализ проведён с использованием теста Тьюки после двухфакторного ANOVA. † — $p = 0,0503$; $p < 0,05$ — *; $p < 0,01$ — **; ns — различия статистически незначимы.

	IE1-IE1	IE1-IE2	IE1-121	IE2-IE1	IE2-IE2	IE2-121	121-IE1	121-IE2	121-121
IE1-IE1		ns	ns	ns	ns	**	ns	**	ns
IE1-IE2	—		ns	ns	ns	*	ns	*	ns
IE1-121	—	—		ns	ns	*	ns	*	ns
IE2-IE1	—	—	—		ns	*	ns	*	ns
IE2-IE2	—	—	—	—		*	ns	†	ns
IE2-121	—	—	—	—	—		*	ns	*
121-IE1	—	—	—	—	—	—		ns	ns
121-IE2	—	—	—	—	—	—	—		*
121-121	—	—	—	—	—	—	—	—	

Серия последовательных делеций промотора 121 позволила выделить участки длиной 266, 202 и 137 пар нуклеотидов, обладающие остаточной транскрипционной активностью и рассматриваемые в качестве кандидатов на роль минимальных промоторов. Эти укороченные варианты могут быть использованы для построения индуцируемых систем экспрессии,

скрининга энхансеров и других задач, требующих минимального фона транскрипции. Таким образом, промотор 121 формирует универсальную регуляторную платформу, сочетающую возможность получения высокоуровневой конститутивной экспрессии (в полном варианте) с тонкой настройкой уровня транскрипции (в укороченных версиях). Это представляет собой значительное технологическое преимущество: уровень экспрессии может быть адаптирован под конкретные задачи — от визуализации с помощью репортёров до продуцирования ферментов и метаболически нагружающих белков — с сохранением высокой эффективности в клеточных линиях различного происхождения (Miyata et al., 2019; Tokumoto et al., 2020).

Промотор 121 (Pv.00443) представляет собой основу универсальной регуляторной архитектуры, адаптированной для клеточной линии Pv11 и родственных ей систем. Он обеспечивает высокий уровень транскрипционной активности, превосходящий показатели всех протестированных аналогов в Pv11, и демонстрирует воспроизводимую экспрессию в различных клеточных линиях насекомого происхождения, включая S2, SaPe-4 и Sf9. Конструкции на его основе поддерживают стабильную экспрессию после селекции и сохраняют активность в условиях длительного культивирования. Эти характеристики существенно расширяют биотехнологический потенциал Pv11, способствуя увеличению выхода целевых белков при стандартном культивировании, упрощая получение стабильных трансформантов, а также формируя технологическую основу для создания настраиваемых экспрессионных систем. В сочетании с индуцируемыми и минимальными промоторными элементами промотор 121 может эффективно использоваться в подходах, направленных на «сухое» хранение и последующее восстановление функциональной активности биомолекул (Miyata et al., 2019).

Эти характеристики существенно повышают биотехнологическую ценность клеточной платформы Pv11, обеспечивая как увеличение выхода целевых белков при стандартном культивировании, так и упрощение получения стабильных производственных линий. В сочетании с индуцируемыми и минимальными промоторными элементами промотор 121 формирует гибкую основу для построения настраиваемых систем экспрессии, пригодных для применения в технологиях «сухого» хранения и восстановления функциональной активности после регидратации (Miyata et al., 2019).

3.7.3. Управляемая экспрессия генов в системе Tet-On на основе минимального промотора

Для решения прикладных задач на платформе Pv11, помимо высокоуровневой конститутивной экспрессии, необходима система тонкой регуляции, позволяющая по требованию запускать синтез целевых белков и минимизировать фоновую транскрипцию (Tokumoto et al., 2020).

Для реализации точно регулируемой экспрессии в клетках Pv11 использовались укороченные производные эндогенного промотора 121 в качестве минимальных транскрипционных ядер. Установлено, что минимальный промотор длиной 202 п.н., встроенный в кассету Tet-On, обеспечивает индуцируемую экспрессию как в стандартных условиях культивирования, так и при индукции ангиобиоза посредством трегалозной обработки. Таким образом, система сохраняет функциональность в обоих режимах работы клеточной платформы Pv11.

Анализ последовательности показал, что данный фрагмент содержит ключевые элементы транскрипционного ядра — ТАТА-box, Inr, DPE и так называемые bridge-элементы. При этом их нуклеотидные последовательности существенно отличаются от типичных для

млекопитающих, что, вероятно, объясняет низкую эффективность минимальных промоторов, разработанных для эукариот (например, CMVmin), в клетках Pv11 (Tokumoto et al., 2020).

Экспериментальные данные подтвердили, что при введении доксициклина (+Dox) в системе pTetO–202bp наблюдается отчётливое накопление белка-репортёра AcGFP1, регистрируемое как методом флуоресцентной микроскопии, так и при иммуноблоттинге. В неиндуцированном состоянии (–Dox) уровень экспрессии остаётся минимальным. Этот эффект воспроизводится как в стандартной среде IPL-41, так и при обработке 600 мМ трегалозы, имитирующей условия подготовки к ангиодробиозу. Полученные результаты согласуются с данными люциферазного анализа (Рисунок 47), проведённого в пяти независимых повторах.

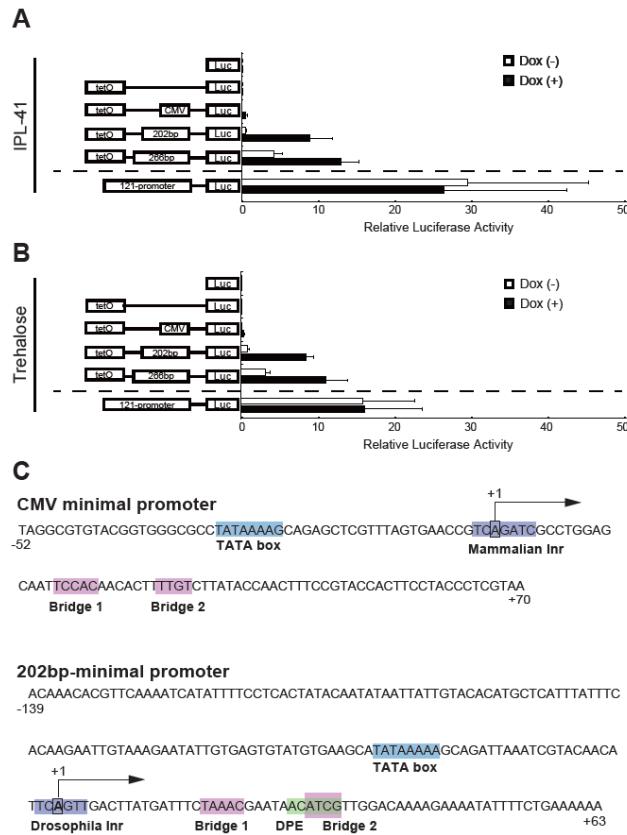


Рисунок 47 – Идентификация минимального промотора для индуцируемой системы экспрессии в клетках Pv11. Активность люциферазы измерялась в клетках Pv11, трансфецированных векторными конструкциями и культивируемых либо в стандартной среде (IPL-41, панель А), либо с добавлением 600 мМ трегалозы (панель В). Слева представлена схема конструкций, справа — относительные значения по результатам люциферазного анализа. Нормализованные данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (SD); каждый анализ выполнен в пяти повторах. Сравнение предсказанных элементов минимальных промоторов: CMV и 202 п.н. В промоторе 202 п.н. идентифицирован инициаторный элемент (Inr), по структуре близкий к аналогичным элементам *Drosophila*. Обозначения: Inr — инициатор; DPE — элемент промотора вниз по потоку от стартовой позиции. Цветовая маркировка: TATA-box — синий, Inr — фиолетовый, Bridge — красный, DPE — зелёный. Позиции начала транскрипции обозначены как +1 и стрелкой. Предсказание структуры промотора выполнено с использованием программы Elements Navigation Tool с настройками по умолчанию.

Таким образом, минимальный промотор длиной 202 п.н. обеспечивает низкий уровень фоновой транскрипции и надёжный индуцируемый отклик в рамках системы Tet-On, что критически важно для прикладных задач, в которых требуется активация синтеза белка непосредственно перед технологически значимыми этапами (Tokumoto et al., 2020).

Применимость управляемой экспрессии к функционально значимым белкам была продемонстрирована на модели фермента AMV RT α . Для проверки работоспособности системы Tet-On в прикладном режиме в клетках Pv11 была сконструирована экспрессионная кассета с минимальным промотором длиной 202 п.н. (pTetO-202bp-AMV RT α). Добавление доксициклина активировало регуляторный белок rtTA и запускало транскрипцию целевого гена. На белковом уровне это проявлялось в появлении характерной полосы AMV RT α на иммуноблоте при минимальном фоновом сигнале в отсутствие индуктора. Эффект воспроизводился как в стандартной среде IPL-41, так и при обработке 600 мМ трегалозы, что подтверждает совместимость системы с режимом индукции ангиодробиоза (Рисунок 48 А).

Функциональная активность экспрессируемого фермента была подтверждена прямым измерением обратной транскриптазной активности в лизатах клеток. В условиях с доксициклином (+Dox) активность возрастала статистически значимо по сравнению с неиндуцированными условиями (-Dox) и техническими контролями, при этом фоновый сигнал оставался на уровне предела детекции (Рисунок 48 В). Таким образом, система Tet-On обеспечивает не только управляемую экспрессию структурно сложного прикладного белка, но и сохранение его катализитической функции после индукции.

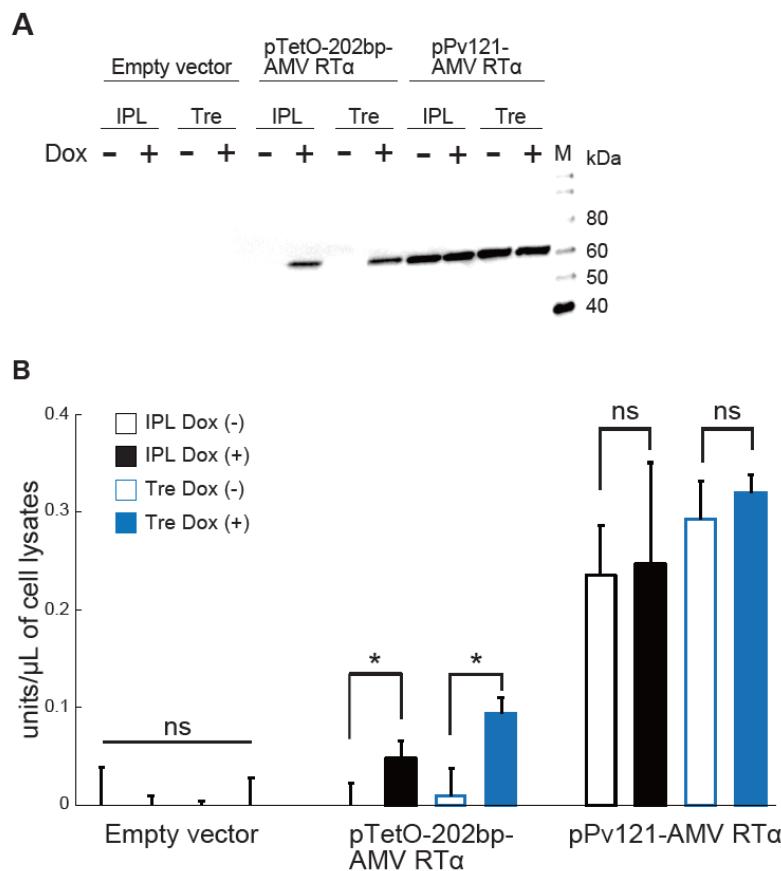


Рисунок 48 – Экспрессия α -субъединицы обратной транскриптазы вируса миелобластоза птиц (AMV RT α) и прямое измерение активности обратной транскриптазы. А) Вестерн-блот-анализ выполнен на клетках Pv11, трансфенированных указанными векторами. Обозначения: IPL — среда IPL-41; Tre — раствор трегалозы 600 мМ; дорожка M — белковый маркер. Б) Активность AMV RT α измеряли непосредственно в лизатах клеток Pv11, трансфенированных указанными векторами. Нормированные значения представлены как среднее \pm стандартное отклонение (SD). * — значимо при $p < 0,05$; ns — различия статистически недостоверны; $n = 3$ в каждой группе.

Таким образом, использование минимального промотора длиной 202 п.н. в составе Tet-On-системы обеспечивает эффективный инструмент управляемой экспрессии в клетках *Pv11*. Данная система сочетает низкий уровень фоновой транскрипции с высоким индуцируемым выходом, совместима с режимами трегалозной индукции ангиодробиоза и пригодна как для экспрессии маркеров (например, *GFP*, *Luc*), так и для белков с

ферментативной активностью, имеющих прикладное значение (на примере *AMVRTα*) (Tokumoto et al., 2020).

3.7.4. Геномная модификация клеток *Pv11* и стабильная интеграция экспрессионных конструкций

Для практического использования платформы *Pv11* в биотехнологии необходимы линии со стабильной и предсказуемой экспрессией целевых конструкций.

В целях обеспечения стабильной и фенотипически нейтральной экспрессии в клеточной линии *Pv11* была реализована адресная интеграция кассеты *AcGFP1-ZeoR* в локус *Pv.00443* методом CRIS-PITCh. На Рисунке 49 представлена: схема таргетирования и расположение flankирующих праймеров, использованных для последующей верификации интеграции, микрофотографии после зеоцинового отбора, демонстрирующие формирование *AcGFP1*-позитивной линии, а также подтверждение точности вставки на основе геномной ПЦР и секвенирования ампликона (Miyata et al., 2021). Сравнительный анализ с линией *Pv11-KH*, содержащей случайную интеграцию репортёрной кассеты, показал, что выживаемость после цикла «обезвоживание—регистратация» у линии с адресной интеграцией не отличается от исходной *Pv11*, в то время как при случайной вставке наблюдается статистически значимое снижение этого показателя (Рисунок 49 D). Эти данные указывают на риск фенотипических нарушений при случайной интеграции и подчёркивают преимущества адресной интеграции для сохранения способности к ангиодробиозу (Sogame et al., 2017).

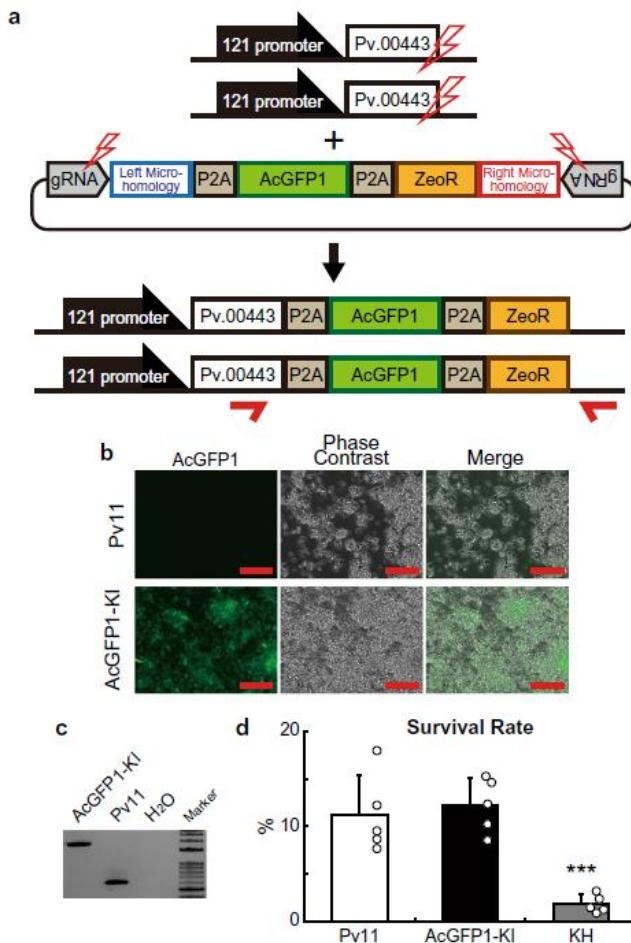


Рисунок 49 – Интеграция генов AcGFP1 и устойчивости к зеоцину (ZeoR) в 5'-фланкирующий участок стоп-кодона гена Pv.00443. А) Представлена схема адресной интеграции по системе РІТCh: в клетки Pv11 были ко-трансфицированы векторы, экспрессирующие Cas9 и направляющую РНК (gRNA), а также донорная конструкция, содержащая кассету AcGFP1–ZeoR. Красными стрелками обозначены праймеры, использованные для геномной ПЦР на ДНК, выделенной из клеток после селекции по устойчивости к зеоцину и экспрессии AcGFP1. В) Изображения клеток получены с использованием стандартного флуоресцентного микроскопа. С) Выполнена геномная ПЦР с клеточной ДНК. D) Сравнена выживаемость двух клеточных линий, стабильно экспрессирующих AcGFP1, после цикла «обезвоживание—регидратация»: линия с адресной интеграцией (AcGFP1-KI) и линия со случайной интеграцией (Pv11-KH). В области, предшествующей Pv.00443, расположен сильный эндогенный промотор 121. Масштаб: 100 мкм. Значения приведены как среднее ± стандартное отклонение; n = 5 в каждой группе. ***p = 0,0008 (по сравнению с Pv11) и 0,0003 (по сравнению с AcGFP1-KI).

Для реализации целевых модификаций была сформирована необходимая инструментальная база. Конструкции на основе полинуклеотидного промотора *PvGapdh* обеспечивают эффективную экспрессию белков с ядерной локализацией (включая *Cas9*) (Рисунок 50). 5'-область гена *PvU6* использована как основа Pol III-промотора для транскрипции направляющих РНК (gRNA) (Рисунок 51). Дополнительно вектор *PvU6b* был модифицирован фланкирующими участками тРНК (DmtRNA) для обхода ограничений инициации транскрипции на нуклеотидах G/A, что позволило обеспечить функциональную экспрессию gRNA в клетках *Pv11* (Sogame et al., 2017; Okada et al., 2015).

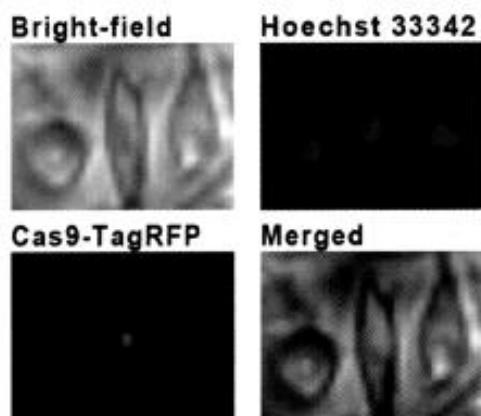


Рисунок 50 – Субклеточная локализация экзогенно экспрессируемого Cas9 в клетках *Pv11*. Экспрессионный вектор, кодирующий слитый белок Cas9-TagRFP, был трансфицирован в клетки *Pv11*.

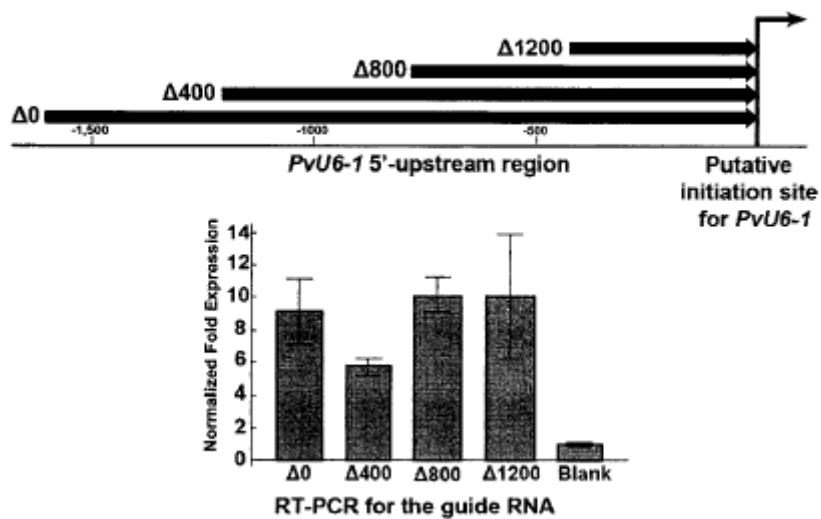


Рисунок 51 – Активность промотора типа Pol III в 5'-регуляторной области *PvU6-1*. Минимальный делеционный вариант $\Delta 1200$ этой области обеспечивает эффективную экспрессию направляющей РНК в клетках *Pv11*.

С целью минимизации риска непреднамеренных фенотипических эффектов были идентифицированы участки генома *Pv11*, пригодные для безопасной вставки (genomic safe harbors, GSH). На основе анализа случайных интеграций и последующих экспериментов по адресной интеграции были выделены три валидированных локуса на хромосоме 1: Chr1:21143572, Chr1:21155382 и Chr1:21164645. Вставка кассет *AcGFP1/ZeoR* в эти участки не вызывала нарушений ангиодробиоза или клеточной пролиферации (Рисунок 52) (Miyata et al., 2022).

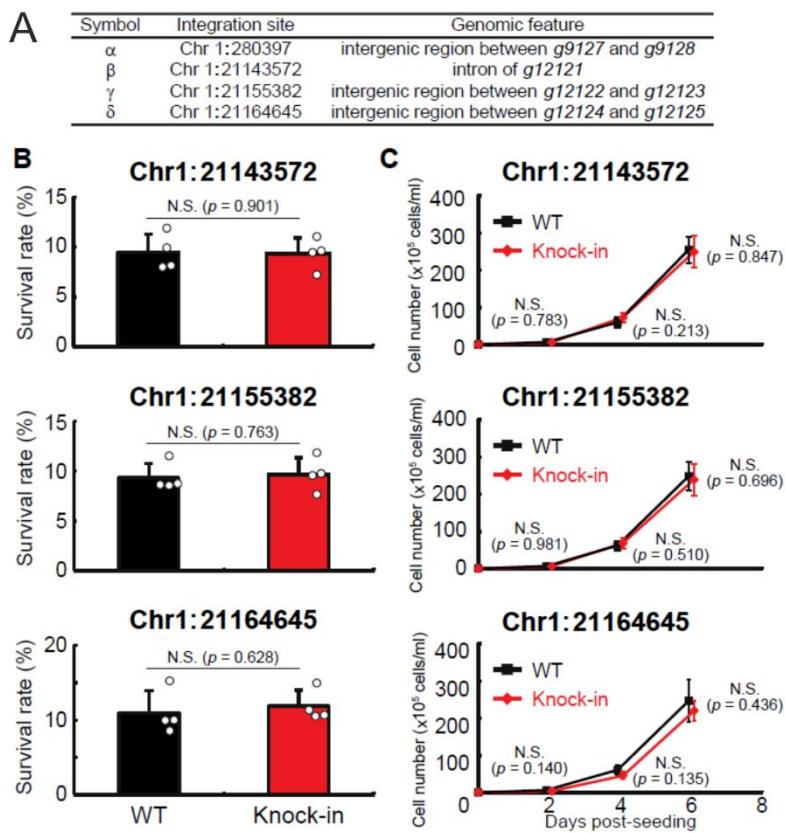


Рисунок 52 – А) Кандидаты на геномно-безопасные участки и их характеристика. Б) Результаты оценки выживаемости после цикла «обезвоживание — регидратация» для каждой линии с адресной интеграцией. С) Данные о скорости пролиферации клеточных линий с адресной интеграцией. Значения выражены как среднее \pm стандартное отклонение; $n = 4$ в каждой группе. N.S. — различия статистически незначимы.

Для создания модульной платформы экспрессии на основе безопасной геномной гавани (GSH) Chr1:21164645 были сконструированы донорные конструкции с варьирующейся длиной гомологичных плеч. Оптимальная эффективность интеграции наблюдалась при длине плеч ≥ 250 пар нуклеотидов: доля двойных позитивных клеток ($\text{HaloTag}^+/\text{AcGFP1}^+$) достигала $\sim 24\text{--}26\%$ при длине плеч от 250 до 1000 п.н. В то же время

сокращение гомологических участков до 0–125 п.н. сопровождалось значительным снижением эффективности таргетной вставки.

Таким образом, варьирование конструкции донора в пределах указанного диапазона позволяет добиться надёжной и воспроизводимой интеграции кассет с генами интереса без ущерба для критически важных характеристик клеток Pv11. Долговременная стабильность экспрессии и фенотипа подтверждена на модели с интегрированной копией AcGFP1 в локус Chr1:21164645: даже спустя более года культивирования без селективного давления сохранялись стабильный уровень флуоресценции, способность к ангиобиозу и темп клеточного роста (Рисунок 53). Это подтверждает функциональную надёжность выбранного GSH и его пригодность в качестве универсальной платформы для стабильной загрузки экспрессионных модулей (Miyata et al., 2022).

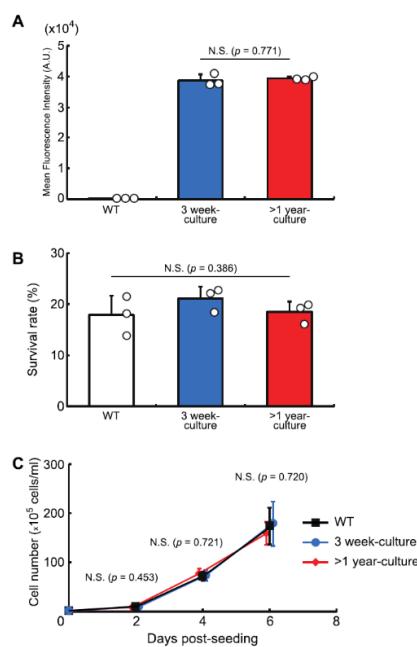


Рисунок 53 – Эффекты длительного культивирования после адресной интеграции в геномно-безопасный участок Chr1:21164645. А) Стабильность экспрессии AcGFP1 после >1 года культивирования без зеоцина. В) Выживаемость клеток после цикла «обезвоживание–регидратация» после >1 года культивирования без зеоцина. С) Скорость пролиферации клеток после >1 года культивирования без зеоцина. Данные приведены как среднее \pm SD; n = 3 для А и В, n = 4 для С. N.S. — статистически незначимо.

В качестве альтернативы конститутивной экспрессии в клетках Pv11 была реализована управляемая система Tet-On на базе минимального промотора длиной 202 п.н., выделенного из последовательности промотора 121. Эта система демонстрирует чётко индуцируемую экспрессию как в стандартных условиях культивирования (среда IPL-41), так и при активации ангиобиоза посредством трегалозной обработки. Она успешно применяется для экспрессии как репортёрных белков (AcGFP1, люцифераза), так и каталитически активных ферментов, включая AMV RTa, что подтверждено данными вестерн-блоттинга и функциональными тестами на ферментативную активность. Индуцированный уровень экспрессии в системе Tet-On в среднем составляет 30–50% от активности конститутивного промотора 121, что обусловлено необходимостью ко-трансфекции двухвекторных конструкций. Для повышения эффективности предполагается создание линий со стабильной экспрессией трансактиватора (Tokumoto et al., 2020).

Функциональная пригодность клеточной платформы Pv11 для долговременного «сухого» хранения биологически активных компонентов подтверждена на модели Pv11-Luc. После полного высушивания и даже по прошествии 372 суток хранения при комнатной температуре сохранялась измеримая активность люциферазы в живой фракции клеток. Удельная активность фермента на выжившую клетку не снижалась, что свидетельствует о сохранении каталитически компетентного белка и стабильности внутриклеточной среды в условиях ангиобиоза (Kikuta et al., 2017).

Разработанная система адресной модификации генома клеток Pv11 обеспечивает стабильную и фенотипически нейтральную экспрессию целевых генов. Показано, что адресная интеграция в безопасный геномный локус не нарушает способности клеток к ангиобиозу и не влияет на их жизнеспособность в условиях длительного культивирования. Таким

образом, клеточная линия Pv11 представляет собой надёжную платформу для создания стабильных трансформантов, пригодных как для фундаментальных исследований регуляции в условиях стресса, так и для прикладных биотехнологических задач, включая долговременное хранение и программируемую экспрессию функциональных белков (Miyata et al., 2022; Sogame et al., 2017).

3.7.5. Заключение к разделу

В совокупности представленные данные подтверждают технологическую состоятельность выбранной стратегии генетической модификации клеток линии Pv11 и закладывают основу для воспроизводимой работы с подобной системой. Показано, что применение сильных конститутивных промоторов в сочетании с оптимизированными элементами экспрессии обеспечивает стабильную продукцию целевых конструкций без выраженного влияния на критически важные фенотипические признаки. Это особенно важно для клеток с ангидробиотическим потенциалом, где даже незначительное вмешательство может нарушить хрупкое равновесие механизмов, обеспечивающих толерантность к обезвоживанию.

Таким образом, создана функциональная платформа для дальнейших биотехнологического применения, включая долговременное хранение и экспрессию функциональных белков в высушенном состоянии с возможностью восстановления их активности после регидратации.

Наиболее существенным методологическим достижением следует признать ориентацию на адресную интеграцию конструкций в безопасные для фенотипа геномные локусы. Это решение снижает вероятность случайной дестабилизации регуляторных узлов, поддерживающих ангидробиоз, и одновременно повышает предсказуемость уровня

экспрессии. С практической точки зрения данный подход способствует повышению масштабируемости и воспроизводимости экспериментов, а также упрощает документирование траекторий клеточных линий для целей внутрилабораторного контроля качества и возможной сертификации.

Несмотря на достигнутый прогресс, ряд ограничений сохраняет актуальность. На уровне клеточной популяции возможны вариации числа копий и локального хроматинового контекста, способные вызывать дрейф экспрессии при длительном культивировании. Методологически остается риск внеплановых редактирований и скрытых геномных перестроек, не фиксируемых стандартными процедурами скрининга. Кроме того, чувствительность клеток к параметрам предобработки и регидратации требует стандартизации не только рецептур и режимов, но и метрологического контроля осмотических переходов. Эти факторы не снижают ценности полученных результатов, но задают контур необходимых дальнейших проверок и уточнений.

Особого внимания заслуживает прикладной потенциал разработанной платформы. В краткосрочной перспективе она может быть использована для экспрессии диагностических и каталитических белков с последующим хранением в сухом виде при комнатной температуре. В среднесрочной перспективе возможно проектирование кассет с комбинированной регуляцией, основанной на внешних индуктивных сигналах, что позволит упростить технологические схемы и снизить зависимость от узких условий культивирования. В долгосрочной перспективе не исключен перенос разработанных решений в другие виды насекомых или даже в клетки млекопитающих (Subbot et al., 2021) при условии соблюдения принципов безопасной интеграции и контролируемой экспрессии. Хотя такой перенос сопряжен с рядом технических и биологических барьеров, он представляется логичным с учетом высокой

степени консервативности ключевых регуляторных и транспортных модулей.

Полученные результаты подтверждают не только принципиальную возможность стабильной генетической модификации клеток линии Pv11, но и обозначают реалистический путь дальнейшего усложнения применяемых инструментов. При этом обеспечивается усиление контроля над биобезопасностью и воспроизводимостью экспериментов. Выводы носят сдержанно-оптимистичный характер: имеется достаточная эмпирическая база для расширения области применения подхода. Потенциальные риски идентифицированы, formalизованы и сведены к управляемым технологическим процедурам. Широкий набор проверяемых гипотез обеспечивает возможность поэтапного повышения степени обоснованности без необходимости радикального пересмотра методологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа посвящена анализу одного из наиболее необычных и перспективных биологических феноменов — ангидробиоза, с акцентом на комплексное исследование молекулярных, клеточных и физиологических механизмов этого состояния на модели личинок африканского комара-звонца *Polypedilum vanderplanki*. Проведенный обзор и сопоставительный анализ позволили не только систематизировать существующие представления, но и выявить ключевые особенности, делающие этот организм уникальным объектом для изучения механизмов выживания в условиях экстремального обезвоживания.

Ангидробиоз — это не просто форма криптобиоза, а фундаментальное адаптивное состояние, позволяющее организмам переходить в обратимое существование при почти полном отсутствии воды. В отличие от гипометаболических состояний (спячка, диапауза), ангидробиоз характеризуется почти полным подавлением метаболизма, стабилизацией макромолекул, мембран и генетического материала, а также возможностью длительного пребывания в неактивном состоянии без потери жизнеспособности. Объекты, способные к ангидробиозу, обнаружены во многих филогенетических линиях — от дрожжей и бактерий до многоклеточных животных, таких как тихоходки, нематоды и коловратки. Эта конвергентная эволюция свидетельствует о высоком отборном давлении, сопровождавшем освоение организмами нестабильных местообитаний, лишённых устойчивого водного режима.

Анализ распределения и молекулярных основ ангидробиоза в животном мире показал, что его реализация основывается на совокупности модульных адаптаций, различающихся по таксономическим группам. Классическими элементами ангидробиоза являются: накопление трегалозы, стабилизирующей белки и липидные мембранны; экспрессия LEA- и IDP-

белков, препятствующих агрегации и денатурации; образование стеклоподобной матрицы, ограничивающей молекулярную подвижность; а также развитие программ репарации ДНК и антиоксидантной защиты. Важно, что у разных организмов комбинации этих механизмов варьируют: у колораток и тихоходок трегалоза может отсутствовать, а акцент смешён на IDP-белки и уникальные структурные протекторы. В модели *Artemia* активно задействованы как сахарные, так и белковые защитные каскады, включая системную перестройку хроматиновой архитектуры.

Особое место среди моделей занимает *Polypedilum vanderplanki*. Этот организм представляет собой первый и пока единственный задокументированный случай настоящего ангидробиоза у насекомых — группы, традиционно рассматривавшейся как чувствительная к обезвоживанию. В отличие от других организмов-ангидробионтов, *P. vanderplanki* обладает хорошо развитой многоклеточной организацией, полноценным циклом развития, и демонстрирует способность переносить полную дегидратацию с последующим полным восстановлением физиологических функций, включая репродуктивную способность.

В диссертационной работе было показано, что личинки *P. vanderplanki* развиваются в пересыхающих временных водоёмах в засушливых регионах Африки, что обуславливает наличие мощного экологического давления и формирует условия, способствующие отбору механизмов полной толерантности к дегидратации. Ключевыми адаптациями являются поведенческие (строительство трубчатых гнёзд, замедление высушивания), биохимические (интенсивное накопление трегалозы), и молекулярные (экспрессия LEA-белков и активация специфических программ стресс-ответа).

Показано, что трегалоза играет центральную роль не только как витрификатор, но и как энергетический метаболит, активируемый при регидратации. Её накопление индуцируется экспрессией ферментного

каскада, синтезирующего трегалозу из гликогена, а последующее расщепление после восстановления водного баланса сопровождается мобилизацией энергии, необходимой для восстановления физиологических процессов. Такое функциональное двойное назначение придаёт трегалозе особый статус в системе ангидробиоза *P. vanderplanki*.

Дополнительный уровень устойчивости обеспечивается белками позднего эмбриогенеза (LEA), которые, согласно обзору и сравнительным данным, действуют как универсальные молекулярные щиты, препятствующие агрегации, денатурации и деструкции клеточных структур. Эти белки, ранее описанные преимущественно у растений и нематод, у *P. vanderplanki* демонстрируют высокую тканевую специфичность и динамичную регуляцию экспрессии, что подчёркивает сложность и координированность защитной программы.

Особо важной составляющей устойчивости личинок *P. vanderplanki* является способность к репарации ДНК и подавлению оксидативного стресса. Были обоснованы параллели с другими экстремофильными организмами (тихоходки, бделлоидные коловратки), у которых репаративные механизмы играют решающую роль в сохранении геномной стабильности. В случае *P. vanderplanki*, переход в «сухое» состояние многократно увеличивает устойчивость личинок к радиационному облучению и другим физическим стрессам. Показано, что витрификация и понижение активности метаболизма снижают генерацию свободных радикалов, а активные ферментативные и молекулярные каскады запускаются в момент регидратации, устранивая повреждения на уровне ДНК и мембран. Это подтверждается экспериментально зафиксированной способностью личинок переносить дозы ионизирующего излучения, фатальные для большинства животных.

Сравнительный анализ с близкородственными видами — *P. rembai* (толерантный) и *P. nubifer* (чувствительный) — подтвердил, что

ангидробиоз не является универсальной чертой рода, а представляет собой результат специфической адаптации. Это открывает возможности для глубокого филогенетического анализа и изучения эволюции молекулярных механизмов устойчивости к обезвоживанию.

На основании совокупности полученных данных можно утверждать, что *Polypedilum vanderplanki* представляет собой уникальную модель для изучения ангидробиоза, сочетающую полноразмерную многоклеточную организацию, доступность для микродиссекции и пространственного анализа тканей, возможность сравнительных исследований с близкородственными видами, а также доказанную прикладную ценность. С точки зрения практического применения, результаты, полученные на *P. vanderplanki*, открывают перспективы в ряде направлений: в технологиях сухой биоконсервации — благодаря использованию трегалозы и LEA-белков для хранения биоматериалов без замораживания; в генной инженерии — через экспрессию «ангидробиотических» генов в культурах растений или животных клетках для повышения их устойчивости к стрессам; в медицине — при создании препаратов для стабилизации белков и клеток в условиях низкой гидратации, например, при трансплантации и хранении тканей; и в астробиологии — как модель биовыживаемости в условиях вакуума, радиации и экстремальных температур.

Таким образом, ангидробиоз — это не только уникальное физиологическое состояние, но и полноценная научная платформа, сочетающая в себе фундаментальные и прикладные аспекты. В контексте продолжающегося изменения климата, роста интереса к пространственной биологии и расширения задач синтетической биологии, значение таких моделей, как *Polypedilum vanderplanki*, будет только возрастать.

Работа, представленная в данной диссертации, позволяет заключить, что ангидробиоз — это не изолированное биологическое явление, а сложный, многоуровневый процесс, способный изменить представление о

границах жизнеспособности, устойчивости и адаптивности живых организмов. Его дальнейшее изучение, особенно на уровне многоклеточных моделей, обещает важные открытия на стыке биологии, медицины, инженерии и экологии.

ВЫВОДЫ

1. В ходе исследования установлено, что двухцепочечные разрывы ДНК являются физиологическим компонентом цикла ангидробиоза у *Polypedilum vanderplanki*. Их формирование происходит в контролируемых пределах и не приводит к необратимым повреждениям генома.

2. Выявлено, что процессы репарации ДНК при выходе из сухого состояния сопровождаются переключением на эксцизионные пути восстановления, что подтверждает наличие у *P. vanderplanki* специализированного механизма поддержания геномной стабильности.

3. Радиоустойчивость *P. vanderplanki* имеет адаптивное происхождение и рассматривается как результат отбора, направленного на устойчивость к фрагментации ДНК при циклах обезвоживания и регидратации.

4. Установлено, что феномен кросс-устойчивости объединяет реакции на радиационные и десикационные повреждения, подтверждая общность защитных программ и их системную природу.

5. Эволюция генома *P. vanderplanki* сопровождалась направленными изменениями нуклеотидного состава и архитектуры. Повышенное содержание АТ-пар и перераспределение мобильных элементов отражают адаптивные перестройки, возникшие под влиянием циклического обезвоживания.

6. Обнаруженные изменения геномной структуры свидетельствуют о формировании у вида особого архитектурного типа генома, обеспечивающего высокую пластичность при экстремальных стрессах.

7. Защитные гены *P. vanderplanki* формируют кластерную организацию в составе островов ARId, что обеспечивает согласованную активацию при сушке и согласуется с принципом пространственной координации регуляции.

8. Показано, что в островах ARId сосредоточены ключевые семейства PvLea и PvLil, отличающиеся высокой индукцией при обезвоживании, что подтверждает их центральную роль в формировании устойчивого состояния клетки.

9. Хромосома IV играет ведущую роль в адаптивной эволюции *P. vanderplanki*. На ней локализованы основные кластеры генов ангидробиоза, а также области, демонстрирующие повышенные темпы аминокислотных замен.

10. Концентрация видоспецифичных генов и следы ускоренного отбора на одной хромосоме указывают на хромосомно-центрированную организацию адаптационных процессов.

11. Комплекс защитных генов *P. vanderplanki* сформировался за счёт горизонтальных переносов и последующей паралогизации, что подтверждено тандемным расположением шаперонов и антиоксидантов.

12. Обнаруженные генные дупликации указывают на множественные независимые источники инноваций и демонстрируют эволюционную стратегию расширения функционального репертуара через внутренние копирования.

13. Появившиеся в результате дупликаций гены прошли функциональную дивергенцию, проявляющуюся в различиях внутриклеточной локализации и биофизических свойств белков.

14. На примере семейств *PvLIL* и *PvLEA* показано формирование модульной архитектуры защитного ответа, в которой отдельные паралоги обеспечивают комплементарные функции.

15. Метаболические исследования показали, что в процессе регидратации активируется катаболизм трегалозы с последующим частичным восстановлением запасов гликогена в первые часы после начала регидратации.

16. Выявленная динамика свидетельствует о том, что энергетическое обеспечение раннего восстановления тканей осуществляется за счёт предсуществующих резервов и быстрой мобилизации углеводов.

17. Создан воспроизводимый инструментарий для генетической модификации клеточной линии *Pv11*, включающий управляемую экспрессию по системе Tet-On и адресную интеграцию конструкций без потери способности клеток к ангиодробиозу.

18. Полученные подходы обеспечивают экспериментальную основу для изучения регуляторных механизмов устойчивости и позволяют стандартизировать работу с модельной системой *P. vanderplanki* на клеточном уровне.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает признательность коллегам, принимавшим участие в планировании и выполнении исследований, получении экспериментальных данных, их анализе и обсуждении результатов, включая партнёрские коллективы Сколковского института науки и технологий, Института проблем передачи информации РАН, института RIKEN, университета Juntendo, Института медико-биологических проблем РАН, Японского космического агентства JAXA, Госкорпорации «Роскосмос», Зоологического института РАН, Института цитологии и генетики СО РАН и Национального института агробиологических наук NARO.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АДФ — аденоzinидифосфат
- АТФ — аденоzinтрифосфат
- АФК — активные формы кислорода
- АФК — активные формы кислорода
- ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
- кДНК — комплементарная ДНК
- мРНК — матричная рибонуклеиновая кислота
- НАДФН / NADPH — nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
(reduced) — восстановленная форма
- никотинамидадениндинуклеотидфосфата
- ПЦР — полимеразная цепная реакция
- РНК — рибонуклеиновая кислота
- рРНК — рибосомная рибонуклеиновая кислота
- тРНК — транспортная рибонуклеиновая кислота
- ЦТК — цикл трикарбоновых кислот
- АЕС — Adenylate Energy Charge — аденилатный энергетический заряд
- AMV — Avian Myeloblastosis Virus — вирус миелобластоза птиц, источник обратной транскриптазы AMV
- AQP — aquaporin — аквапорин
- AUGUSTUS — AUGUSTUS gene prediction software — программа предсказания генов AUGUSTUS
- BER — Base Excision Repair — репарация оснований ДНК по пути вырезания повреждённых оснований
- BLAT — BLAST-like Alignment Tool — инструмент для быстрого выравнивания последовательностей

BUSCO — Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs — тестовый набор универсальных одноэкземплярных ортологов для оценки полноты сборки генома

CAGE — Cap Analysis of Gene Expression — анализ экспрессии на основе кэпированных транскриптов

CAGE-seq — Cap Analysis of Gene Expression sequencing — секвенирование библиотек CAGE

CAHS — Cytoplasmic Abundant Heat Soluble proteins — цитоплазматические терморастворимые белки, обильно представленные (семейство CAHS)

CEGMA — Core Eukaryotic Genes Mapping Approach — метод аннотирования на основе набора «ядровых» эукариотических генов

CE-TOFMS — Capillary Electrophoresis Time-Of-Flight Mass Spectrometry — капиллярный электрофорез с время-пролётной масс-спектрометрией

CTR-seq — Cap-Trap RNA sequencing — секвенирование полноразмерных кэпированных транскриптов методом Cap-trapper

D0 — day 0 of desiccation — начальная стадия, до начала десикации

D48 — day 48 of desiccation — стадия после завершения высушивания

DBD — DNA-Binding Domain — домен связывания с ДНК

DNA — deoxyribonucleic acid — дезоксирибонуклеиновая кислота

EDTA — Ethylenediaminetetraacetic acid — этилендиаминетрауксусная кислота

EST — Expressed Sequence Tag — метка экспрессированной последовательности

G0 — G0 phase — фаза покоя клеточного цикла

GMAP — Genomic Mapping and Alignment Program — программа для картирования и выравнивания транскриптов на геном

GO — Gene Ontology — онтология генов

GSEA — Gene Set Enrichment Analysis — анализ обогащения наборов генов

GSH — glutathione — восстановленный глутатион

HR — Homologous Recombination — гомологичная рекомбинация

HSE — Heat Shock Element(s) — элементы ответа на тепловой шок в промоторных областях

HSF — Heat Shock Factor(s) — факторы теплового шока

HSP — Heat Shock Proteins — белки теплового шока

IDP — Intrinsically Disordered Proteins — интринзически неупорядоченные белки

KEGG — Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes — Киотская энциклопедия генов и геномов

LEA — Late Embryogenesis Abundant proteins — белки поздней эмбриогенеза (LEA-белки)

MAHS — Mitochondrial Abundant Heat Soluble proteins — митохондриальные терморастворимые белки, обильно представленные (семейство MAHS)

MEME — Multiple EM for Motif Elicitation — программный пакет MEME для поиска последовательностных мотивов

MS — Mass Spectrometry — масс-спектрометрия

NER — Nucleotide Excision Repair — нуклеотидная эксцизионная репарация ДНК

NHEJ — Non-Homologous End Joining — негомологичное соединение концов ДНК

PBS — Phosphate Buffered Saline — фосфатно-солевой буферный раствор

PIMT — Protein L-isoaspartyl methyltransferase — L-изоаспартил-метилтрансфераза, фермент репарации повреждённых белков

Pv11 — permanent cell line from *Polypedilum vanderplanki* — устойчивая к ангидробиозу клеточная линия личинок *P. vanderplanki*

qPCR — quantitative Polymerase Chain Reaction — количественная ПЦР в реальном времени

RNA — ribonucleic acid — рибонуклеиновая кислота

RNA-seq — RNA sequencing — высокопроизводительное секвенирование РНК

ROS — Reactive Oxygen Species — реактивные формы кислорода

RPKM — Reads Per Kilobase per Million mapped reads — число чтений на килобазу транскрипта на миллион картированных чтений

SAHS — Secreted Abundant Heat Soluble proteins — секретируемые терморастворимые белки, обильно представленные (семейство SAHS)

SD — standard deviation — стандартное отклонение

SDS — Sodium Dodecyl Sulfate — додецилсульфат натрия

T0 — time 0 — исходное состояние до воздействия

T48 — time 48 — состояние после 48 часов воздействия

TAD — Transactivation Domain — транзактивационный домен белка

TCTAGAA — консенсусный мотив связывания HSF TCTAGAA — консенсусный сайт связывания факторов теплового шока

TMD — Transmembrane Domain — трансмембранный домен

TOFMS — Time-Of-Flight Mass Spectrometry — время-пролётная масс-спектрометрия

TPM — Transcripts Per Million — число транскриптов на миллион картированных чтений

TPS — trehalose-6-phosphate synthase — трегалозо-6-фосфат-синтаза

TRET1 — Trehalose Transporter 1 — фасилитированный транспортер трегалозы 1

TRX — thioredoxin — тиоредоксин

UVC — ultraviolet C — ультрафиолетовое излучение диапазона С

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alagar Boopathy, L. R. Mechanisms tailoring the expression of heat shock proteins to proteostasis challenges / L. R. Alagar Boopathy, S. Jacob-Tomas, C. Alecki, M. Vera // Journal of Biological Chemistry. – 2022. – Vol. 298. – № 5. – P. 101796.
2. Alexa, A. Improved scoring of functional groups from gene expression data by decorrelating GO graph structure / A. Alexa, J. Rahnenführer, T. Lengauer // Bioinformatics. – 2006. – Vol. 22. – № 13. – P. 1600-1607.
3. Amara, I. Insights into Late Embryogenesis Abundant (LEA) Proteins in Plants: From Structure to the Functions / I. Amara, I. Zaidi, K. Masmoudi, et al. // American Journal of Plant Sciences. – 2014. – Vol. 5. – P. 3440–3455.
4. Arakawa, K. Examples of Extreme Survival: Tardigrade Genomics and Molecular Anhydrobiology / K. Arakawa // Annual Review of Animal Biosciences. – 2022. – Vol. 10. – P. 17–37.
5. Aroian, R. V. A Free-living Panagrolaimus sp. from Armenia Can Survive in Anhydrobiosis for 8.7 Years / R. V. Aroian, L. Carta, I. Kaloshian, P. W. Sternberg // Journal of Nematology. – 1993. – Vol. 25. – № 3. – P. 500-502.
6. Barrugia, G. Oxidative stress and programmed cell death in yeast / G. Barrugia, R. Balzan // Frontiers in Oncology. – 2012. – Vol. 2. – P. 64.
7. Atkin, O. K. The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance / O. K. Atkin, D. Macherel // Annals of Botany. – 2009. – Vol. 103. – № 4. – P. 581–597.
8. Banfi, D. The Role of Heat Shock Proteins in Insect Stress Response, Immunity, and Climate Adaptation / D. Banfi, T. Bianchi, M. Mastore, M. F. Brivio // Insects. – 2025. – Vol. 16. – № 7. – P. 741.

9. Becker, A. The regulation of trehalose metabolism in insects / A. Becker, P. Schlöder, J. E. Steele, G. Wegener // *Experientia*. – 1996. – Vol. 52. – № 5. – P. 433–439.
10. Behm, C. A. The role of trehalose in the physiology of nematodes / C. A. Behm // *International Journal for Parasitology*. – 1997. – Vol. 27. – № 2. – P. 215-229.
11. Belott, C. J. Membraneless and membrane-bound organelles in an anhydrobiotic cell line are protected from desiccation-induced damage / C. J. Belott, O. A. Gusev, T. Kikawada, M. A. Menze // *Cell Stress & Chaperones*. – 2024. – Vol. 29. – № 3. – P. 425-436.
12. Benoit, J. B. Suppression of water loss during adult diapause in the northern house mosquito, *Culex pipiens* / J. B. Benoit, D. L. Denlinger // *Journal of Experimental Biology*. – 2007. – Vol. 210. – № Pt 2. – P. 217-226.
13. Bolger, A. M. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data / A. M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel // *Bioinformatics*. – 2014. – Vol. 30. – № 15. – P. 2114-2120.
14. Boothby, T. C. Tardigrades Use Intrinsically Disordered Proteins to Survive Desiccation / T. C. Boothby, H. Tapia, A. H. Brozena, S. Piszkiewicz, A. E. Smith, I. Giovannini, L. Rebecchi, G. J. Pielak, D. Koshland, B. Goldstein // *Molecular Cell*. – 2017. – Vol. 65. – № 6. – P. 975-984.
15. Boschetti, C. Biochemical diversification through foreign gene expression in bdelloid rotifers / C. Boschetti, A. Carr, A. Crisp, I. Eyres, Y. Wang-Koh, E. Lubzens, T. G. Barraclough, G. Micklem, A. Tunnacliffe // *PLoS Genetics*. – 2012. – Vol. 8. – № 11. – P. e1003035.
16. Boschetti, C. Foreign genes and novel hydrophilic protein genes participate in the desiccation response of the bdelloid rotifer *Adineta ricciae* / C.

- Boschetti, N. Pouchkina-Stantcheva, P. Hoffmann, A. Tunnacliffe // Journal of Experimental Biology. – 2011. – Vol. 214. – № Pt 1. – P. 59–68.
17. Brendonck, L. Egg banks in freshwater zooplankton: evolutionary and ecological archives in the sediment / L. Brendonck, L. De Meester // Hydrobiologia. – 2003. – Vol. 491. – P. 65–84.
18. Bright, E. G. Spatial distribution of resting stages of crustaceans and other aquatic invertebrates in playa wetlands / E. G. Bright, E. A. Bergey // Journal of Crustacean Biology. – 2015. – Vol. 35. – № 4. – P. 515–521.
19. Browne, J. A. Dehydration-specific induction of hydrophilic protein genes in the anhydrobiotic nematode *Aphelenchus avenae* / J. A. Browne, K. M. Dolan, T. Tyson, K. Goyal, A. Tunnacliffe, A. M. Burnell // Eukaryotic Cell. – 2004. – Vol. 3. – № 4. – P. 966–975.
20. Buitink, J. Glass formation in plant anhydrobiotes: Survival in the dry state / J. Buitink, O. Leprince // Cryobiology. – 2004. – Vol. 48. – № 3. – P. 215–228
21. Calahan, D. Genetic analysis of desiccation tolerance in *Sachharomyces cerevisiae* / D. Calahan, M. Dunham, C. DeSevo, D. E. Koshland // Genetics. – 2011. – Vol. 189. – № 2. – P. 507–519.
22. Camacho, C. BLAST+: architecture and applications / C. Camacho, G. Coulouris, V. Avagyan, N. Ma, J. Papadopoulos, K. Bealer, T. L. Madden // BMC Bioinformatics. – 2009. – Vol. 10. – P. 421.
23. Cannone, N. Moss survival through in situ cryptobiosis after six centuries of glacier burial / N. Cannone, F. Malfasi, S. Strumia, M. Guglielmin, P. Convey // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. – P. 4438.
24. Caprioli, M. Recipes for a successful anhydrobiosis in bdelloid rotifers / M. Caprioli, C. Ricci // Hydrobiologia. – 2001. – Vol. 446. – P. 13–17.
25. Carbonell-Sala, S. CapTrap-seq: A platform-agnostic and quantitative approach for high-fidelity full-length RNA sequencing / S. Carbonell-Sala, K. Sato, W. Shao, L. P. B. Bouvrette, G. Mikijan, M. Michel, J. Steinberg,

- S. Masaki, S. Fukada, M. Takahashi, L. Calviello, T. Lassmann, M. J. L. de Hoon, R. Guigó, J. Pané-Farré // *Nature Communications*. – 2024. – Vol. 15. – № 1. – P. 5278.
26. Carninci, P. Molecular biology: The transcriptional landscape of the mammalian genome / P. Carninci, T. Kasukawa, S. Katayama, J. Gough, M. C. Frith, N. Maeda, R. Oyama, T. Ravasi, B. Lenhard, C. Wells, R. Kodzius, K. Shimokawa, V. B. Bajic, S. E. Brenner, S. Batalov, A. R. R. Forrest, M. Zavolan, M. J. Davis, L. G. Wilming, Y. Hayashizaki // *Science*. – 2005. – Vol. 309. – № 5740. – P. 1559–1563.
27. Chakrabortee, S. Hydrophilic protein associated with desiccation tolerance exhibits broad protein stabilization function / S. Chakrabortee, C. Boschetti, L. J. Walton, S. Sarkar, D. C. Rubinsztein, A. Tunnacliffe // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2007. – Vol. 104. – № 46. – P. 18073-18078.
28. Chatani, M. Acute transcriptional up-regulation specific to osteoblasts/osteoclasts in medaka fish immediately after exposure to microgravity / M. Chatani, H. Morimoto, K. Takeyama, A. Mantoku, N. Tanigawa, K. Kubota, H. Suzuki, S. Uchida, F. Tanigaki, M. Shirakawa, O. Gusev, V. Sychev, Y. Takano, T. Itoh, A. Kudo // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – Article 39545.
29. Chen, T. Functional characterization of artemin, a ferritin homolog synthesized in *Artemia* embryos during encystment and diapause / T. Chen, T. S. Villeneuve, K. A. Garant, R. Amons, T. H. MacRae // *The FEBS Journal*. – 2007. – Vol. 274. – № 4. – P. 1093-1101.
30. Clegg, J. S. Cryptobiosis — a peculiar state of biological organization / J. S. Clegg // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. – 2001. – Vol. 128. – № 4. – P. 613–624.

- 31.Clegg, J. S. Desiccation tolerance in encysted embryos of the animal extremophile *Artemia* / J. S. Clegg // Integrative and Comparative Biology. – 2005. – Vol. 45. – № 5. – P. 715–724.
- 32.Clegg, J. S. The metabolic status of diapause embryos of *Artemia franciscana* as studied by ³¹P-NMR spectroscopy / J. S. Clegg, A. H. Warner, C. N. A. Trotman // Physiological Zoology. – 1996. – Vol. 69. – № 1. – P. 49–66.
- 33.Conesa, A. A survey of best practices for RNA-seq data analysis / A. Conesa, P. Madrigal, S. Tarazona, D. Gomez-Cabrero, A. Cervera, A. McPherson, M. W. Szcześniak, D. J. Gaffney, L. L. Elo, X. Zhang, A. Mortazavi // Genome Biology. – 2016. – Vol. 17. – P. 13.
- 34.Cornette, R. The induction of anhydrobiosis in the sleeping chironomid: current status of our knowledge / R. Cornette, T. Kikawada // IUBMB Life. – 2011. – Vol. 63. – № 6. – P. 419–429.
- 35.Cornette, R. Chironomid midges (Diptera, Chironomidae) show extremely small genome sizes / R. Cornette, O. Gusev, Y. Nakahara, S. Shimura, T. Kikawada, T. Okuda // Zoological Science. – 2015. – Vol. 32. – № 3. – P. 248–254.
- 36.Cornette, R. Identification of anhydrobiosis-related genes from an expressed sequence tag database in the cryptobiotic midge *Polypedilum vanderplanki* (Diptera; Chironomidae) / R. Cornette, Y. Kanamori, M. Watanabe, Y. Nakahara, O. Gusev, K. Mitsumasu, K. Kadono-Okuda, M. Shimomura, K. Mita, T. Kikawada, T. Okuda // Journal of Biological Chemistry. – 2010. – Vol. 285. – № 46. – P. 35889–35899.
- 37.Cornette, R. A new anhydrobiotic midge from Malawi, *Polypedilum pembai* sp. nov. (Diptera: Chironomidae), closely related to the desiccation tolerant midge, *Polypedilum vanderplanki* Hinton / R. Cornette, N. Yamamoto, M. Yamamoto, T. Kobayashi, N. A. Petrova, O. Gusev, S.

- Shimura, T. Kikawada, D. Pemba, T. Okuda // Systematic Entomology. – 2017. – Vol. 42. – № 4. – P. 814–825.
38. Cornette, R. Oxidative stress is an essential factor for the induction of anhydrobiosis in the desiccation-tolerant midge, *Polypedilum vanderplanki* (Diptera, Chironomidae) / R. Cornette, H. P. Indo, K.-I. Iwata, Y. Hagiwara-Komoda, Y. Nakahara, O. Gusev, T. Kikawada, T. Okuda, H. J. Majima // Mitochondrion. – 2023. – Vol. 73. – P. 84–94.
39. Crowe, J. H. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose / J. H. Crowe, L. M. Crowe, D. Chapman // Science. – 1984. – Vol. 223. – № 4637. – P. 701–703.
40. Crowe, J. H. Anhydrobiosis / J. H. Crowe, F. A. Hoekstra, L. M. Crowe // Annual Review of Physiology. – 1992. – Vol. 54. – P. 579–599.
41. Crowe, J. H. The role of vitrification in anhydrobiosis / J. H. Crowe, J. F. Carpenter, L. M. Crowe // Annual Review of Physiology. – 1998. – Vol. 60. – P. 73–103.
42. Dai, L. SETD4 regulates cell quiescence and catalyzes the trimethylation of H4K20 during diapause formation in Artemia / L. Dai, S. Ye, H. W. Li, D. F. Chen, H. L. Wang, S. N. Jia, C. Lin, J. S. Yang, F. Yang, H. Nagasawa, W. J. Yang // Molecular and Cellular Biology. – 2017. – Vol. 37. – № 7. – P. e00453-16.
43. Deviatiiarov, R. Diversity and regulation of S-adenosylmethionine dependent methyltransferases in the anhydrobiotic midge / R. Deviatiiarov, R. Ayupov, A. Laikov, E. Shagimardanova, T. Kikawada, O. Gusev // Insects. – 2020. – Vol. 11. – № 9. – P. 634.
44. Deviatiiarov, R. The complete mitochondrial genome of an anhydrobiotic midge *Polypedilum vanderplanki* (Chironomidae, Diptera) / R. Deviatiiarov, T. Kikawada, O. Gusev // Mitochondrial DNA Part A: DNA Mapping, Sequencing, and Analysis. – 2017. – Vol. 28. – № 2. – P. 218–220.

- 45.Deviatiarov, R. Application of a CAGE Method to an Avian Development Study / R. Deviatiarov, M. Lizio, O. Gusev // Methods Mol Biol. – 2017. – V. 1650. – P. 101-109.
- 46.Dobin, A. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner / A. Dobin, C. A. Davis, F. Schlesinger, J. Drenkow, C. Zaleski, S. Jha, P. Batut, M. Chaisson, T. R. Gingeras // Bioinformatics. – 2013. – Vol. 29. – № 1. – P. 15-21.
- 47.Doyère, M. L. Mémoire sur les Tardigrades / M. L. Doyère // Annales des Sciences Naturelles. – 1842. – Vol. 18. – P. 5–35.
- 48.Duan, S. H3K56 acetylation regulates chromatin maturation following DNA replication / S. Duan, I. M. Nodelman, H. Zhou, T. Tsukiyama, G. D. Bowman, Z. Zhang // Nature Communications. – 2025. – Vol. 16. – № 1. – P. 134.
- 49.Duchet, C. Effects of *Bacillus thuringiensis israelensis* and spinosad on adult emergence of the non-biting midges *Polypedilum nubifer* (Skuse) and *Tanytarsus curticornis* Kieffer (Diptera: Chironomidae) in coastal wetlands / C. Duchet, E. Franquet, L. Lagadic, C. Lagneau // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2015. – Vol. 115. – P. 272–278.
- 50.Dupont, S. Survival kit of *Saccharomyces cerevisiae* for anhydrobiosis / S. Dupont, A. Rapoport, P. Gervais, L. Beney // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2014. – Vol. 98. – № 21. – P. 8821-8834.
- 51.Elbein, A. D. New insights on trehalose: a multifunctional molecule / A. D. Elbein, Y. T. Pan, I. Pastuszak, D. Carroll // Glycobiology. – 2003. – Vol. 13. – № 4. – P. 17R-27R.
- 52.Elder, C. A. Biomolecular condensates — prerequisites for anhydrobiosis? / C. A. Elder, H. M. Skaggs, L. M. A. Dirk, D. F. Grimm, C. J. Belott, W. F. Wolkers, H. Oldenhof, V. N. Uversky, A. B. Downie, M. A. Menze // Protein Science. – 2025. – Vol. 34. – № 7. – P. e70192.

- 53.Emms, D. M. OrthoFinder: phylogenetic orthology inference for comparative genomics / D. M. Emms, S. Kelly // Genome Biology. – 2019. – Vol. 20. – № 1. – P. 238.
- 54.Erdmann, W. Tardigrades in space research – Past and future / W. Erdmann, Ł. Kaczmarek // Origins of Life and Evolution of Biospheres. – 2017. – Vol. 47. – № 4. – P. 545–553.
- 55.Erkut, C. The glyoxylate shunt is essential for desiccation tolerance in *C. elegans* and budding yeast / C. Erkut, V. R. Gade, S. Laxman, T. V. Kurzchalia // eLife. – 2016. – Vol. 5. – P. e13614.
- 56.Erkut, C. How worms survive desiccation: Trehalose pro water / C. Erkut, S. Penkov, K. Fahmy, T. V. Kurzchalia // Worm. – 2012. – Vol. 1. – № 1. – P. 61-65.
- 57.Erkut, C. Trehalose renders the dauer larva of *Caenorhabditis elegans* resistant to extreme desiccation / C. Erkut, S. Penkov, H. Khesbak, D. Vorkel, J. M. Verbavatz, K. Fahmy, T. V. Kurzchalia // Current Biology. – 2011. – Vol. 21. – № 15. – P. 1331-1336.
- 58.Escarcega, R. D. The Tardigrade damage suppressor protein Dsup promotes DNA damage in neurons / R. D. Escarcega, A. A. Patil, M. D. Meyer, J. F. Moruno-Manchon, A. D. Silvagnoli, L. D. McCullough, A. S. Tsvetkov // Molecular and Cellular Neuroscience. – 2023. – Vol. 125. – P. 103826.
- 59.Evangelista, C. C. S. Multiple genes contribute to anhydrobiosis (tolerance to extreme desiccation) in the nematode *Panagrolaimus superbus* / C. C. S. Evangelista, G. V. Guidelli, G. Borges, T. F. Araujo, T. A. J. Souza, U. P. D. C. Neves, A. Tunnacliffe, T. C. Pereira // Genetics and Molecular Biology. – 2017. – Vol. 40. – № 4. – P. 790-802.
- 60.Ewels, P. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report / P. Ewels, M. Magnusson, S. Lundin, M. Käller // Bioinformatics. – 2016. – Vol. 32. – № 19. – P. 3047-3048.

61. Eyres, I. Horizontal gene transfer in bdelloid rotifers is ancient, ongoing and more frequent in species from desiccating habitats / I. Eyres, C. Boschetti, A. Crisp, T. P. Smith, D. Fontaneto, A. Tunnacliffe, T. G. Barraclough // BMC Biology. – 2015. – Vol. 13. – P. 90.
62. Finn, R. N. Insect glycerol transporters evolved by functional co-option and gene replacement / R. N. Finn, F. Chauvigné, J. A. Stavang, X. Belles, J. Cerdà // Nature Communications. – 2015. – Vol. 6. – P. 7814.
63. França, M. B. Oxidative stress and its effects during dehydration / M. B. França, A. D. Panek, E. C. A. Eleutherio // Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology. – 2007. – Vol. 146. – № 4. – P. 621–631.
64. Franks, F. Materials science and the production of shelf-stable biologicals / F. Franks, R. H. M. Hatley, S. F. Mathias // BioPharm. – 1991. – Vol. 4. – № 8. – P. 38.
65. Giovannini, I. Production of reactive oxygen species and involvement of bioprotectants during anhydrobiosis in the tardigrade *Paramacrobiotus spatialis* / I. Giovannini, T. C. Boothby, M. Cesari, B. Goldstein, R. Guidetti, L. Rebecchi // Scientific Reports. – 2022. – Vol. 12. – № 1. – P. 1938.
66. Gladyshev, E. Extreme resistance of bdelloid rotifers to ionizing radiation / E. Gladyshev, M. Meselson // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2008. – Vol. 105. – № 13. – P. 5139–5144.
67. Goyal, K. Molecular anhydrobiology: identifying molecules implicated in invertebrate anhydrobiosis / K. Goyal, L. J. Walton, J. A. Browne, A. M. Burnell, A. Tunnacliffe // Integrative and Comparative Biology. – 2005. – Vol. 45. – № 5. – P. 702-709.

- 68.Goyal, K. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress / K. Goyal, L. J. Walton, A. Tunnacliffe // Biochemical Journal. – 2005. – Vol. 388. – № Pt 1. – P. 151-157.
- 69.Goyal, K. Transition from natively unfolded to folded state induced by desiccation in an anhydrobiotic nematode protein / K. Goyal, L. Tisi, A. Basran, J. Browne, A. Burnell, J. Zurdo, A. Tunnacliffe // The Journal of Biological Chemistry. – 2003. – Vol. 278. – № 15. – P. 12977–12984.
- 70.Grapotte, M. Discovery of widespread transcription initiation at microsatellites predictable by sequence-based deep neural network / M. Grapotte, M. Saraswat, C. Bessière, D. Fagan, C. Chatelain, P. Collet, P. Cuscó, R. C. Larosiliere, K. Hettne, H. Imrichová, J. Kuijpers, N. Nariai, J. Rung, H. Takahashi, E. Valen, B. van de Sande, P. Carninci, M. J. L. de Hoon, W. W. Wasserman, L. Bréhélin, C.-H. Lecellier // Nature Communications. – 2021. – Vol. 12. – № 1. – P. 3297.
- 71.Grzyb, T. Introduction to bacterial anhydrobiosis: A general perspective and the mechanisms of desiccation-associated damage / T. Grzyb, A. Skłodowska // Microorganisms. – 2022. – Vol. 10. – № 2. – P. 432.
- 72.Guidetti, R. On dormancy strategies in tardigrades / R. Guidetti, T. Altiero, L. Rebecchi // Journal of Insect Physiology. – 2011. – Vol. 57. – № 5. – P. 567–576.
- 73.Guidetti, R. What can we learn from the toughest animals of the Earth? Water bears (tardigrades) as multicellular model organisms in order to perform scientific preparations for lunar exploration / R. Guidetti, A. M. Rizzo, T. Altiero, L. Rebecchi // Planetary and Space Science. – 2012. – Vol. 74. – № 1. – P. 97–102.
- 74.Gusev, O. Expression of heat shock protein-coding genes associated with anhydrobiosis in an African chironomid *Polypedilum vanderplanki* / O. Gusev, R. Cornette, T. Kikawada, T. Okuda // Cell Stress and Chaperones. – 2011. – Vol. 16. – № 1. – P. 81–90.

75. Gusev, O. An anhydrobiotic insect, *Polypedilum vanderplanki* as a tool for astrobiology / O. Gusev, Y. Nakahara, V. Sychev, M. Levinskikh, N. Novikova, V. Alexeev, T. Kikawada, T. Okuda // Space Utilization Research. – 2008. – Vol. 24. – P. 306–309.
76. Gusev, O. Anhydrobiosis-associated nuclear DNA damage and repair in the sleeping chironomid: Linkage with radioresistance / O. Gusev, Y. Nakahara, V. Vanyagina, L. Malutina, R. Cornette, T. Sakashita, N. Hamada, T. Kikawada, Y. Kobayashi, T. Okuda // PLOS ONE. – 2010. – Vol. 5. – № 11. – P. e14008.
77. Gusev, O. Comparative genome sequencing reveals genomic signature of extreme desiccation tolerance in the anhydrobiotic midge / O. Gusev, Y. Suetsugu, R. Cornette, T. Kawashima, M. D. Logacheva, A. S. Kondrashov, A. A. Penin, R. Hatanaka, S. Kikuta, S. Shimura, H. Kanamori, Y. Katayose, T. Matsumoto, E. Shagimardanova, D. Alexeev, V. Govorun, J. Wisecaver, A. Mikheyev, R. Koyanagi, M. Fujie, T. Nishiyama, S. Shigenobu, T. F. Shibata, V. Golygina, M. Hasebe, T. Okuda, N. Satoh, T. Kikawada // Nature Communications. – 2014. – Vol. 5. – P. 4784.
78. Hinton, H. E. Cryptobiosis in the larva of *Polypedilum vanderplanki* Hint. (Chironomidae) / H. E. Hinton // Journal of Insect Physiology. – 1960. – Vol. 5. – № 3-4. – P. 286-300.
79. Hand, S. C. Mitochondrial bioenergetics and desiccation tolerance / S. C. Hand, M. A. Menze, A. Borcar, Y. Patil, J. A. Covi // IUBMB Life. – 2018. – Vol. 70. – № 12. – P. 1275–1286.
80. Hand, S. C. Diapause and anhydrobiosis in embryos of *Artemia franciscana*: metabolic depression, LEA proteins and water stress / S. C. Hand, Y. Patil, S. Li, N. Chakraborty, A. Borcar, M. A. Menze, L. C. Boswell, D. Moore, M. Toner // Cryobiology and Cryotechnology. – 2013. – Vol. 59. – № 1. – P. 41–46.

81. Hand, S. C. LEA proteins during water stress: not just for plants anymore / S. C. Hand, M. A. Menze, M. Toner, L. Boswell, D. Moore // Annual Review of Physiology. – 2011. – Vol. 73. – P. 115-134.
82. Hashimoto, T. Extremotolerant tardigrade genome and improved radiotolerance of human cultured cells by tardigrade-unique protein / T. Hashimoto, D. D. Horikawa, Y. Saito, H. Kuwahara, H. Kozuka-Hata, T. Shin-I, Y. Minakuchi, K. Ohishi, A. Motoyama, T. Aizu, A. Enomoto, K. Kondo, S. Tanaka, Y. Hara, S. Koshikawa, H. Sagara, T. Miura, S. I. Yokobori, K. Miyagawa, Y. Suzuki, T. Kubo, M. Oyama, Y. Kohara, A. Fujiyama, K. Arakawa, T. Katayama, A. Toyoda, T. Kunieda // Nature Communications. – 2016. – Vol. 7. – P. 12808.
83. Hatanaka, R. Diversity of the expression profiles of late embryogenesis abundant (LEA) protein encoding genes in the anhydrobiotic midge *Polypedilum vanderplanki* / R. Hatanaka, O. Gusev, R. Cornette, S. Shimura, S. Kikuta, J. Okada, T. Okuda, T. Kikawada // Planta. – 2015. – Vol. 242. – № 2. – P. 451–459.
84. Hengherr, S. Trehalose and anhydrobiosis in tardigrades – evidence for divergence in responses to dehydration / S. Hengherr, A. G. Heyer, H. R. Köhler, R. O. Schill // The FEBS Journal. – 2008. – Vol. 275. – № 2. – P. 281-288.
85. Hengherr, S. High-temperature tolerance in anhydrobiotic tardigrades is limited by glass transition / S. Hengherr, M. R. Worland, A. Reuner, F. Brümmer, R. O. Schill // Physiological and Biochemical Zoology. – 2009. – Vol. 82. – № 6. – P. 749-755.
86. Hespeels, B. Back to the roots, desiccation and radiation resistances are ancestral characters in bdelloid rotifers / B. Hespeels, D. Fontaneto, V. Cornet, S. Penninckx, J. Berthe, L. Bruneau, J. W. Lerrick, E. Rapport, J. Bailly, N. Debortoli, N. Iakovenko, K. Janko, A. C. Heuskin, S. Lucas, B.

Hallet, K. Van Doninck // BMC Biology. – 2023. – Vol. 21. – № 1. – P. 72.

- 87.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 / B. Hespeels, X. Li, J. F. Flot, L. M. Pigneur, J. Malaisse, C. Da Silva, K. Van Doninck // PLOS ONE. – 2015. – Vol. 10. – № 7. – P. e0131313.
- 88.Hespeels, B. Gateway to genetic exchange? DNA double-strand breaks in the bdelloid rotifer *Adineta vaga* submitted to desiccation / B. Hespeels, M. Knapen, D. Hanot-Mambres, A.-C. Heuskin, F. Pineux, S. Lucas, R. Koszul, K. Van Doninck // Journal of Evolutionary Biology. – 2014. – Vol. 27. – № 7. – P. 1334–1345.
- 89.Hibshman, J. D. Mechanisms of Desiccation Tolerance: Themes and Variations in Brine Shrimp, Roundworms, and Tardigrades / J. D. Hibshman, J. S. Clegg, B. Goldstein // Frontiers in Physiology. – 2020. – Vol. 11. – P. 592016.
- 90.Hu, C. Heat shock proteins: Biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities / C. Hu, J. Yang, Z. Qi, H. Wu, B. Wang, F. Zou, H. Mei, J. Liu, W. Wang, Q. Liu // MedComm. – 2022. – Vol. 3. – № 3. – P. e161.
- 91.Hu, Y. The structural stability and chaperone activity of artemin, a ferritin homologue from diapause-destined *Artemia* embryos, depend on different cysteine residues / Y. Hu, S. Bojikova-Fournier, A. M. King, T. H. MacRae // Cell Stress & Chaperones. – 2011. – Vol. 16. – № 2. – P. 133-141.
- 92.Indo, H. P. MnSOD downregulation induced by extremely low 0.1 mGy single and fractionated X-rays and microgravity treatment in human neuroblastoma cell line, NB-1 / H. P. Indo, T. Tomiyoshi, S. Suenaga, K. Tomita, H. Suzuki, D. Masuda, M. Terada, N. Ishioka, O. Gusev, R.

- Cornette, T. Okuda, C. Mukai, H. J. Majima // *J Clin Biochem Nutr.* – 2015. – Vol. 57. – № 2. – P. 98–104.
93. Indo, H. P. A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging / H. P. Indo, H. C. Yen, I. Nakanishi, K.-I. Matsumoto, M. Tamura, Y. Nagano, H. Matsui, O. Gusev, R. Cornette, T. Okuda, Y. Minamiyama, H. Ichikawa, S. Suenaga, M. Oki, T. Sato, T. Ozawa, D. K. Clair, H. J. Majima // *J Clin Biochem Nutr.* – 2015. – Vol. 56. – № 1. – P. 1–7. – DOI: 10.3164/jcbn.14-42.
94. Jain, N. K. Effect of trehalose on protein structure / N. K. Jain, I. Roy // *Protein Science.* – 2009. – Vol. 18. – № 1. – P. 24–36.
95. Jönsson, K. I. Tardigrades survive exposure to space in low Earth orbit / K. I. Jönsson, E. Rabbow, R. O. Schill, M. Harms-Ringdahl, P. Rettberg // *Current Biology.* – 2008. – Vol. 18. – № 17. – P. R729–R731.
96. Kanehisa, M. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs / M. Kanehisa, M. Furumichi, M. Tanabe, Y. Sato, K. Morishima // *Nucleic Acids Research.* – 2017. – Vol. 45. – № D1. – P. D353-D361.
97. Kanehisa, M. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes / M. Kanehisa, S. Goto // *Nucleic Acids Research.* – 2000. – Vol. 28. – № 1. – P. 27-30.
98. Karlsson, J. O. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues / J. O. Karlsson, M. Toner // *Biomaterials.* – 1996. – Vol. 17. – № 3. – P. 243–256.
99. Keilin, D. The problem of anabiosis or latent life: history and current concept / D. Keilin // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences.* – 1959. – Vol. 150. – P. 149–191.
100. Kieliszek, M. The phenomenon of anhydrobiosis – structural and functional changes in yeast cells / M. Kieliszek // *Applied Microbiology and Biotechnology.* – 2025. – Vol. 109. – № 1. – P. 152.

101. Kikawada, T. Factors Inducing Successful Anhydrobiosis in the African Chironomid *Polypedilum vanderplanki*: Significance of the Larval Tubular Nest / T. Kikawada, N. Minakawa, M. Watanabe, T. Okuda // Integrative and Comparative Biology. – 2005. – Vol. 45. – № 5. – P. 710–714.
102. Kikawada, T. Trehalose transporter 1, a facilitated and high-capacity trehalose transporter, allows exogenous trehalose uptake into cells / T. Kikawada, A. Saito, Y. Kanamori, Y. Nakahara, K. Iwata, D. Tanaka, M. Watanabe, T. Okuda // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2007. – Vol. 104. – № 28. – P. 11585–11590.
103. Kikuta, S. Towards water-free biobanks: Long-term dry-preservation at room temperature of desiccation-sensitive enzyme luciferase in air-dried insect cells / S. Kikuta, S. J. Watanabe, R. Sato, O. Gusev, A. Nesmelov, Y. Sogame, R. Cornette, T. Kikawada // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. – P. 6540.
104. Kim, D. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype / D. Kim, J. M. Paggi, C. Park, C. Bennett, S. L. Salzberg // Nature Biotechnology. – 2019. – Vol. 37. – № 8. – P. 907–915.
105. Kim, S. X. Synergy between the small intrinsically disordered protein Hsp12 and trehalose sustain viability after severe desiccation / S. X. Kim, G. Çamdere, X. Hu, D. Koshland, H. Tapia // eLife. – 2018. – Vol. 7. – P. e38337.
106. King, A. M. The small heat shock protein p26 aids development of encysting Artemia embryos, prevents spontaneous diapause termination and protects against stress / A. M. King, T. H. MacRae // PLOS ONE. – 2012. – Vol. 7. – № 8. – P. e43723.

107. King, A. M. Functional differentiation of small heat shock proteins in diapause-destined *Artemia* embryos / A. M. King, J. Toxopeus, T. H. MacRae // The FEBS Journal. – 2013. – Vol. 280. – № 19. – P. 4761-4772.
108. Knutelski, S. Rehydration of the sleeping chironomid, *Polypedilum vanderplanki* Hinton, 1951 larvae from cryptobiotic state up to full physiological hydration (Diptera: Chironomidae) / S. Knutelski, H. Harańczyk, P. Nowak, A. Wróbel, B. Leszczyński, T. Okuda, K. Strzałka, E. Baran // Scientific Reports. – 2022. – Vol. 12. – № 1. – P. 3766.
109. Kondratyeva, S. A. Intracellular localization and gene expression analysis provides new insights on LEA proteins' diversity in anhydrobiotic cell line / S. A. Kondratyeva, T. A. Voronina, A. A. Nesmelov, Y. Miyata, S. Tokumoto, R. Cornette, M. V. Vorontsova, T. Kikawada, O. A. Gusev, E. I. Shagimardanova // Biology. – 2022. – Vol. 11. – № 4. – P. 487.
110. Konrad, C. Absence of Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition but presence of bongrekate-sensitive nucleotide exchange in *C. crangon* and *P. serratus* / C. Konrad, G. Kiss, B. Torocsik, V. Adam-Vizi, C. Chinopoulos // PLOS ONE. – 2012. – Vol. 7. – № 6. – P. e39839.
111. Koshland, D. Desiccation tolerance: an unusual window into stress biology / D. Koshland, H. Tapia // Molecular Biology of the Cell. – 2019. – Vol. 30. – № 6. – P. 737–741.
112. Kozlova, O. S. Heat shock proteins as a part of the response to stress in Chironomidae midges / O. S. Kozlova, Z. I. Abramova, O. A. Gusev, T. Kikawada // FEBS Open Bio. – 2018. – Vol. 8. – Suppl. 1. – P. 130.
113. Kranzfelder, P. Use of Chironomidae (Diptera) Surface-Floating Pupal Exuviae as a Rapid Bioassessment Protocol for Water Bodies / P. Kranzfelder, A. M. Anderson, A. T. Egan, J. E. Mazack, R. W. Bouchard, M. M. Rufer, L. C. Ferrington // Journal of Visualized Experiments. – 2015. – № 101. – P. e52558.

114. Lapinski, J. Anhydrobiosis without trehalose in bdelloid rotifers / J. Lapinski, A. Tunnacliffe // FEBS Letters. – 2003. – Vol. 553. – № 3. – P. 387-390.
115. Lavens, P. The cryptobiotic state of Artemia cysts, its diapause, deactivation and hatching: a review / P. Lavens, P. Sorgeloos // Artemia Research and its Applications. – 1987. – Vol. 3. – P. 3–70.
116. Leeuwenhoek, A. Part of a Letter from Mr. Antony van Leeuwenhoek, concerning the Worms in Sheeps Livers; and concerning the Vinegar Eels / A. Leeuwenhoek // Philosophical Transactions of the Royal Society of London. – 1702. – Vol. 23. – P. 1294–1300.
117. Levine, H. Another view of trehalose for drying and stabilizing biological materials / H. Levine // BioPharm. – 1992. – Vol. 5. – № 4. – P. 36-40.
118. Li, B. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome / B. Li, C. N. Dewey // BMC Bioinformatics. – 2011. – Vol. 12. – P. 323.
119. Liao, Y. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features / Y. Liao, G. K. Smyth, W. Shi // Bioinformatics. – 2014. – Vol. 30. – № 7. – P. 923-930.
120. Lim, S. Tardigrade secretory proteins protect biological structures from desiccation / S. Lim, C. B. Reilly, Z. Barghouti, B. Marelli, J. C. Way, P. A. Silver // Communications Biology. – 2024. – Vol. 7. – № 1. – P. 633.
121. MacRae, T. H. Gene expression, metabolic regulation and stress tolerance during diapause / T. H. MacRae // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2010. – Vol. 67. – № 14. – P. 2405-2424.
122. MacRae, T. H. Stress tolerance during diapause and quiescence of the brine shrimp, Artemia / T. H. MacRae // Cell Stress & Chaperones. – 2016. – Vol. 21. – № 1. – P. 9-18.

123. Makhnovskii, P. A. Alternative transcription start sites contribute to acute-stress-induced transcriptome response in human skeletal muscle / P. A. Makhnovskii, O. A. Gusev, R. O. Bokov, G. R. Gazizova, T. F. Vepkhvadze, E. A. Lysenko, O. L. Vinogradova, F. A. Kolpakov, D. V. Popov // Human Genomics. – 2022. – Vol. 16. – № 1. – Article 24. – DOI: 10.1186/s40246-022-00399-8.
124. Manni, M. BUSCO: Assessing Genomic Data Quality and Beyond / M. Manni, M. R. Berkeley, M. Seppey, E. M. Zdobnov // Current Protocols. – 2021. – Vol. 1. – № 12. – P. e323.
125. Marks, R. A. Life on the dry side: a roadmap to understanding desiccation tolerance and accelerating translational applications / R. A. Marks, J. T. B. Ekwealor, M. A. S. Artur, L. Bondi, T. C. Boothby, O. M. S. Carmo, D. C. Centeno, K. K. Coe, H. J. W. Dace, S. Field, A. Hutt, S. Porembski, A. Thalhammer, L. van der Pas, A. J. Wood, P. Alpert, D. Bartels, S. Boeynaems, M. N. Datar, T. Giese, W. I. Seidou, S. M. Kirchner, J. Köhler, U. G. V. S. S. Kumara, J. Kyung, R. Lyall, B. D. Mishler, J. B. V. T. Ndongmo, M. S. Otegui, V. Reddy, J. Rexroth, S. M. Tebele, R. VanBuren, J. Verdier, U. C. Vothknecht, M. F. Wittenberg, E. Zokov, M. J. Oliver, S. Y. Rhee // Nature Communications. – 2025. – Vol. 16. – № 1. – P. 3284.
126. Marotta, R. Dry and survive: morphological changes during anhydrobiosis in a bdelloid rotifer / R. Marotta, F. Leasi, A. Uggetti, C. Ricci, G. Melone // Journal of Structural Biology. – 2010. – Vol. 171. – № 1. – P. 11-17.
127. Mazin, P. V. Cooption of heat shock regulatory system for anhydrobiosis in the sleeping chironomid *Polypedilum vanderplanki* / P. V. Mazin, E. Shagimardanova, O. Kozlova, A. Cherkasov, R. Sutormin, V. V. Stepanova, A. Stupnikov, M. Logacheva, A. Penin, Y. Sogame, R. Cornette, S. Tokumoto, Y. Miyata, T. Kikawada, M. S. Gelfand, O. Gusev

- // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2018. – Vol. 115. – № 10. – P. E2477–E2486.
128. Menze, M. A. Mitochondrial permeability transition in the crustacean *Artemia franciscana*: absence of a calcium-regulated pore in the face of profound calcium storage / M. A. Menze, K. Hutchinson, S. M. Laborde, S. C. Hand // American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. – 2005. – Vol. 289. – № 1. – P. R68-R76.
129. Mitsumasu, K. Enzymatic control of anhydrobiosis-related accumulation of trehalose in the sleeping chironomid, *Polypedilum vanderplanki* / K. Mitsumasu, Y. Kanamori, M. Fujita, K. Iwata, D. Tanaka, S. Kikuta, M. Watanabe, R. Cornette, T. Okuda, T. Kikawada // The FEBS Journal. – 2010. – Vol. 277. – № 20. – P. 4215-4228.
130. Miyata, Y. Cas9-mediated genome editing reveals a significant contribution of calcium signaling pathways to anhydrobiosis in Pv11 cells / Y. Miyata, H. Fuse, S. Tokumoto, Y. Hiki, R. Deviatiiarov, Y. Yoshida, T. G. Yamada, R. Cornette, O. Gusev, E. Shagimardanova, A. Funahashi, T. Kikawada // Scientific Reports. – 2021. – Vol. 11. – P. 19698.
131. Miyata, Y. Identification of genomic safe harbors in the anhydrobiotic cell line, Pv11 / Y. Miyata, S. Tokumoto, T. Arai, N. Shaikhutdinov, R. Deviatiiarov, H. Fuse, N. Gogoleva, S. Garushyants, A. Cherkasov, A. Ryabova, G. Gazizova, R. Cornette, E. Shagimardanova, O. Gusev, T. Kikawada // Genes. – 2022. – Vol. 13. – № 3. – P. 406.
132. Miyata, Y. Identification of a novel strong promoter from the anhydrobiotic midge, *Polypedilum vanderplanki*, with conserved function in various insect cell lines / Y. Miyata, S. Tokumoto, Y. Sogame, R. Deviatiiarov, J. Okada, R. Cornette, O. Gusev, E. Shagimardanova, M. Sakurai, T. Kikawada // Scientific Reports. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 7004.

133. Mizutani, K. A sodium-dependent trehalose transporter contributes to anhydrobiosis in insect cell line, Pv11 / K. Mizutani, Y. Yoshida, E. Nakanishi, Y. Miyata, S. Tokumoto, H. Fuse, O. Gusev, S. Kikuta, T. Kikawada // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2024. – Vol. 121. – № 14. – P. e2317254121.
134. Møbjerg, N. Survival in extreme environments – on the current knowledge of adaptations in tardigrades / N. Møbjerg, K. A. Halberg, A. Jørgensen, D. K. Persson, M. Bjørn, H. Ramløv, R. M. Kristensen // Acta Physiologica. – 2011. – Vol. 202. – № 3. – P. 409–420.
135. Model, M. The significance of cell water content in cell biology / M. Model // Proceedings of SPIE. – 2019. – Vol. 10887. – P. 1088702.
136. Morano, K. A. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* / K. A. Morano, C. M. Grant, W. S. Moye-Rowley // Genetics. – 2012. – Vol. 190. – № 4. – P. 1157-1195.
137. Nesmelov, A. Involvement of heat shock proteins in invertebrate anhydrobiosis / A. Nesmelov, E. Shagimardanova, T. Kikawada, O. Gusev // In: A. A. Asea, P. Kaur. Heat shock proteins and stress. – 2018. – Vol. 15. – P. 179–192.
138. Nesmelov, A. The Antioxidant System in the Anhydrobiotic Midge as an Essential, Adaptive Mechanism for Desiccation Survival / A. Nesmelov, R. Cornette, O. Gusev, T. Kikawada // Adv Exp Med Biol. – 2018. – V. 1081. – P. 259-270.
139. Neuman, Y. Cryptobiosis: A new theoretical perspective / Y. Neuman // Progress in Biophysics and Molecular Biology. – 2006. – Vol. 92. – № 2. – P. 258–267.
140. Neumann, S. DNA damage in storage cells of anhydrobiotic tardigrades / S. Neumann, A. Reuner, F. Brümmer, R. O. Schill // Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology. – 2009. – Vol. 153. – № 4. – P. 425–429.

141. Neurohr, G. E. Relevance and Regulation of Cell Density / G. E. Neurohr, A. Amon // Trends in Cell Biology. – 2020. – Vol. 30. – № 3. – P. 213–225.
142. Nguyen, K. Trehalose and tardigrade CAHS proteins work synergistically to promote desiccation tolerance / K. Nguyen, S. Kc, T. Gonzalez, H. Tapia, T. C. Boothby // Communications Biology. – 2022. – Vol. 5. – № 1. – P. 1046.
143. Novikova, N. Study of the effects of the outer space environment on dormant forms of microorganisms, fungi and plants in the ‘Expose-R’ experiment / N. Novikova, E. Deshevaya, M. Levinskikh, N. Polikarpov, O. Gusev, V. Sychev // International Journal of Astrobiology. – 2015. – Vol. 14. – № 1. – P. 137–142.
144. Novikova, N. Survival of dormant organisms after long-term exposure to the space environment / N. Novikova, O. Gusev, N. Polikarpov, E. Deshevaya, M. Levinskikh, V. Alekseev, T. Okuda, M. Sugimoto, V. Sychev, A. Grigoriev // Acta Astronautica. – 2011. – Vol. 68. – № 9-10. – P. 1574–1580.
145. Nowell, R. W. Comparative genomics of bdelloid rotifers: Insights from desiccating and nondesiccating species / R. W. Nowell, P. Almeida, C. G. Wilson, T. P. Smith, D. Fontaneto, A. Crisp, G. Micklem, A. Tunnacliffe, C. Boschetti, T. G. Barraclough // PLOS Biology. – 2018. – Vol. 16. – № 4. – P. e2004830.
146. Okada, J. Construction of optimized CRISPR/Cas system to reveal the mechanisms of anhydrobiosis in the sleeping chironomid / J. Okada, S. Kikuta, O. Gusev, Y. Suetsugu, R. Cornette, T. Sakuma, T. Yamamoto, T. Kikawada // Cryobiology and Cryotechnology. – 2015. – Vol. 61. – № 1. – P. 69–73.
147. Oliver, M. J. Desiccation Tolerance: Avoiding Cellular Damage During Drying and Rehydration / M. J. Oliver, J. M. Farrant, H. W. M.

- Hilhorst, S. Mundree, B. Williams, J. D. Bewley // Annual Review of Plant Biology. – 2020. – Vol. 71. – P. 435–460.
148. Patro, R. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression / R. Patro, G. Duggal, M. I. Love, R. A. Irizarry, C. Kingsford // Nature Methods. – 2017. – Vol. 14. – № 4. – P. 417-419.
149. Pereira, C. S. Effect of trehalose on a phospholipid membrane under mechanical stress / C. S. Pereira, P. H. Hünenberger // Biophysical Journal. – 2008. – Vol. 95. – № 8. – P. 3525-3534.
150. Petersen, J. A previously uncharacterized Factor Associated with Metabolism and Energy (FAME/C14orf105/CCDC198/1700011H14Rik) is related to evolutionary adaptation, energy balance, and kidney physiology / J. Petersen, L. Englmaier, A. V. Artemov, I. Poverennaya, R. Mahmoud, T. Bouderlique, M. Tesarova, R. Deviatiiarov, A. Szilvásy-Szabó, E. E. Akkuratov, D. Pajuelo Reguera, H. Zeberg, M. Kaucka, M. E. Kastriti, J. Krivanek, T. Radaszkiewicz, K. Gömöryová, S. Knauth, D. Potesil, Z. Zdrahal, R. S. Ganji, A. Grabowski, M. E. Buhl, T. Zikmund, M. Kavkova, H. Axelson, D. Lindgren, R. Kramann, C. Kuppe, F. Erdélyi, Z. Máté, G. Szabó, T. Koehne, T. Harkany, K. Fried, J. Kaiser, P. Boor, C. Fekete, J. Rozman, J. Kasparek, P. Prochazka, R. Sedlacek, V. Bryja, O. Gusev, I. Adameyko // Nature Communications. – 2023. – Vol. 14. – № 1. – 3092.
151. Petrova, N. A. Karyotypical characteristics of two allopatric African populations of anhydrobiotic *Polypedilum* Kieffer, 1912 (Diptera, Chironomidae) originating from Nigeria and Malawi / N. A. Petrova, R. Cornette, S. Shimura, O. A. Gusev, D. Pemba, T. Kikawada, S. V. Zhirov, T. Okuda // Comparative Cytogenetics. – 2015. – Vol. 9. – № 2. – P. 173–188.
152. Pouchkina-Stantcheva, N. N. Functional divergence of former alleles in an ancient asexual invertebrate / N. N. Pouchkina-Stantcheva, B.

- M. McGee, C. Boschetti, D. Tolleter, S. Chakrabortee, A. V. Popova, F. Meersman, D. Macherel, D. K. Hincha, A. Tunnacliffe // *Science*. – 2007. – Vol. 318. – № 5848. – P. 268-271.
153. Rebecchi, L. Anhydrobiosis: the extreme limit of desiccation tolerance / L. Rebecchi, T. Altiero, R. Guidetti // *Invertebrate Survival Journal*. – 2007. – Vol. 4. – P. 65–81.
154. Rebecchi, L. Extreme-tolerance mechanisms in meiofaunal organisms: a case study with tardigrades, rotifers and nematodes / L. Rebecchi, C. Boschetti, D. R. Nelson // *Hydrobiologia*. – 2020. – Vol. 847. – P. 2779–2799.
155. Rebecchi, L. Survival and DNA degradation in anhydrobiotic tardigrades / L. Rebecchi, M. Cesari, T. Altiero, A. Frigieri, R. Guidetti // *Journal of Experimental Biology*. – 2009. – Vol. 212. – № 24. – P. 4033-4039.
156. Rey-Alfonso, Á. Co-opted and canonical glycerol channels play a major role during anhydrobiosis of an extremophile crustacean / Á. Rey-Alfonso, J. L. Maestro, F. Chauvigné, J. Gómez-Garrido, T. Alioto, P. Bossier, R. N. Finn, J. Cerdà // *BMC Biology*. – 2025. – Vol. 23. – № 1. – P. 151.
157. Ricci, C. Anhydrobiosis in bdelloid species, populations and individuals / C. Ricci, M. Caprioli // *Integrative and Comparative Biology*. – 2005. – Vol. 45. – № 5. – P. 759-763.
158. Ricci, C. Morphological response of a bdelloid rotifer to desiccation / C. Ricci, G. Melone, N. Santo, M. Caprioli // *Journal of Morphology*. – 2003. – Vol. 257. – № 2. – P. 246-253.
159. Richards, A. B. Trehalose: a review of properties, history of use and human consumption / A. B. Richards, S. Krakowka, L. B. Dexter, H. Schmid, A. P. M. Wolterbeek, D. H. Waalkens-Berendsen, A. Shigoyuki,

- M. Kurimoto // Food and Chemical Toxicology. – 2002. – Vol. 40. – № 7. – P. 871–898.
160. Roszkowska, M. How long can tardigrades survive in the anhydrobiotic state? A search for tardigrade anhydrobiosis patterns / M. Roszkowska, B. Gołdyn, D. Wojciechowska, Z. Księžkiewicz, E. Fiałkowska, M. Pluskota, H. Kmita, Ł. Kaczmarek // PLOS ONE. – 2023. – Vol. 18. – № 1. – P. e0270386.
161. Ryabova, A. LEA4 protein is likely to be involved in direct protection of DNA against external damage / A. Ryabova, A. Cherkasov, R. Yamaguchi, R. Cornette, T. Kikawada, O. Gusev // BioNanoScience. – 2016. – Vol. 6. – № 4. – P. 554–557.
162. Ryabova, A. Combined metabolome and transcriptome analysis reveals key components of complete desiccation tolerance in an anhydrobiotic insect / A. Ryabova, R. Cornette, A. Cherkasov, M. Watanabe, T. Okuda, E. Shagimardanova, T. Kikawada, O. Gusev // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2020. – Vol. 117. – № 32. – P. 19209–19220.
163. Ryabova, A. DetR DB: A database of ionizing radiation resistance determinants / A. Ryabova, O. Kozlova, A. Kadirov, A. Ananueva, O. Gusev, E. Shagimardanova // Genes. – 2020. – Vol. 11. – № 12. – P. 1477.
164. Ryabova, A. Genetic background of enhanced radioresistance in an anhydrobiotic insect: Transcriptional response to ionizing radiations and desiccation / A. Ryabova, K. Mukae, A. Cherkasov, R. Cornette, E. Shagimardanova, T. Sakashita, T. Okuda, T. Kikawada, O. Gusev // Extremophiles. – 2017. – Vol. 21. – № 1. – P. 109–120.
165. Sakurai, M. Vitrification is essential for anhydrobiosis in an African chironomid, *Polypedilum vanderplanki* / M. Sakurai, T. Furuki, K. Akao, D. Tanaka, Y. Nakahara, T. Kikawada, M. Watanabe, T. Okuda //

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2008. – Vol. 105. – № 13. – P. 5093–5098.

166. Sales, K. The LEA-like protein HSP 12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress / K. Sales, W. Brandt, E. Rumbak, G. Lindsey // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2000. – Vol. 1463. – № 2. – P. 267-278.
167. Shaikhutdinov, N. M. Population Genomics of Two Closely Related Anhydrobiotic Midges Reveals Differences in Adaptation to Extreme Desiccation / N. M. Shaikhutdinov, G. V. Klink, S. K. Garushyants, O. S. Kozlova, A. V. Cherkasov, T. Kikawada, T. Okuda, D. Pemba, E. I. Shagimardanova, A. A. Penin, R. M. Deviatiarov, G. R. Gazizova, R. Cornette, O. A. Gusev, G. A. Bazykin // *Genome Biology and Evolution*. – 2023. – Vol. 15. – № 10. – P. evad169.
168. Shaikhutdinov, N. Chironomid midges (Diptera) provide insights into genome evolution in extreme environments / N. Shaikhutdinov, O. Gusev // *Current Opinion in Insect Science*. – 2022. – V. 49. – P. 101–107.
169. Shaikhutdinov, N. Microbiota composition data of imago and larval stage of the anhydrobiotic midge / N. Shaikhutdinov, N. E. Gogoleva, O. Gusev, E. I. Shagimardanova // *Data in Brief*. – 2020. – Vol. 33. – P. 106527. – DOI: 10.1016/j.dib.2020.106527
170. Shiraki, T. Cap analysis gene expression for high-throughput analysis of transcriptional starting point and identification of promoter usage / T. Shiraki, S. Kondo, S. Katayama, K. Waki, T. Kasukawa, H. Kawaji, R. Kodzius, A. Watahiki, M. Nakamura, T. Arakawa, S. Fukuda, D. Sasaki, A. Podhajska, M. Harbers, J. Kawai, P. Carninci, Y. Hayashizaki // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2003. – Vol. 100. – № 26. – P. 15776–15781.

171. Shukla, E. Insect trehalase: physiological significance and potential applications / E. Shukla, L. J. Thorat, B. B. Nath, S. M. Gaikwad // Glycobiology. – 2015. – Vol. 25. – № 4. – P. 357–367.
172. Sogame, Y. Establishment of gene transfer and gene silencing methods in a desiccation-tolerant cell line, Pv11 / Y. Sogame, J. Okada, S. Kikuta, Y. Miyata, R. Cornette, O. Gusev, T. Kikawada // Extremophiles. – 2017. – Vol. 21. – № 1. – P. 65–72.
173. Subbot, A. Life-On-Hold: Lanthanoids Rapidly Induce a Reversible Ametabolic State in Mammalian Cells / A. Subbot, S. Kondratieva, I. Novikov, N. Gogoleva, O. Kozlova, I. Chebotar, G. Gazizova, A. Ryabova, M. Vorontsova, T. Kikawada, E. Shagimardanova, O. Gusev // Biology (Basel). – 2021. – V. 10. – № 7. – P. 607
174. Sugimoto, M. Gene expression of rice seeds surviving 13- and 20-month exposure to space environment / M. Sugimoto, Y. Oono, Y. Kawahara, O. Gusev, M. Maekawa, T. Matsumoto, M. Levinskikh, V. Sychev, N. Novikova, A. Grigoriev // Life Sciences in Space Research. – 2016. – Vol. 11. – P. 10–17. – DOI: 10.1016/j.lssr.2016.10.001.
175. Takallou, S. Oxidative stress-induced YAP1 expression is regulated by NCE102, CDA2, and BCS1 / S. Takallou, M. Hajikarimlou, M. Al-Gafari, J. Wang, S. K. Jagadeesan, T. D. D. Kazmirschuk, C. Arnoczki, H. Moteshareie, K. B. Said, T. Azad, M. Holcik, B. Samanfar, M. Smith, A. Golshani // The FEBS Journal. – 2024. – Vol. 291. – № 20. – P. 4602-4618.
176. Tan, J. Stress tolerance in diapausing embryos of *Artemia franciscana* is dependent on heat shock factor 1 (Hsf1) / J. Tan, T. H. MacRae // PLOS ONE. – 2018. – Vol. 13. – № 7. – P. e0200153.
177. Tanaka, A. Stress-dependent cell stiffening by tardigrade tolerance proteins that reversibly form a filamentous network and gel / A. Tanaka, T. Nakano, K. Watanabe, K. Masuda, G. Honda, S. Kamata, R. Yasui, H. Kozuka-Hata, C. Watanabe, T. Chinen, D. Kitagawa, S. Sawai, M. Oyama,

- M. Yanagisawa, T. Kunieda // PLOS Biology. – 2022. – Vol. 20. – № 9. – P. e3001780.
178. Tanaka, S. Novel mitochondria-targeted heat-soluble proteins identified in the anhydrobiotic Tardigrade improve osmotic tolerance of human cells / S. Tanaka, J. Tanaka, Y. Miwa, D. D. Horikawa, T. Katayama, K. Arakawa, A. Toyoda, T. Kubo, T. Kunieda // PLOS ONE. – 2015. – Vol. 10. – № 2. – P. e0118272.
179. Tanaka, Y. Anhydrobiotic chironomid larval motion-based multi-sensing microdevice for the exploration of survivable locations / Y. Tanaka, D. Ma, S. Amaya, Y. Aishan, Y. Shen, S.-I. Funano, T. Tang, Y. Hosokawa, O. Gusev, T. Okuda, T. Kikawada, Y. Yalikun // iScience. – 2022. – Vol. 25. – № 8. – P. 104639.
180. Tapia, H. Trehalose is a versatile and long-lived chaperone for desiccation tolerance / H. Tapia, D. E. Koshland // Current Biology. – 2014. – Vol. 24. – № 23. – P. 2758-2766.
181. Tapia, H. Increasing intracellular trehalose is sufficient to confer desiccation tolerance to *Saccharomyces cerevisiae* / H. Tapia, L. Young, D. Fox, C. R. Bertozzi, D. Koshland // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2015. – Vol. 112. – № 19. – P. 6122-6127.
182. Tokumoto, S. Genome-wide role of HSF1 in transcriptional regulation of desiccation tolerance in the anhydrobiotic cell line, Pv11 / S. Tokumoto, Y. Miyata, R. Deviatiiarov, T. G. Yamada, Y. Hiki, O. Kozlova, Y. Yoshida, R. Cornette, A. Funahashi, E. Shagimardanova, O. Gusev, T. Kikawada // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22. – № 11. – P. 5798.
183. Tokumoto, S. Development of a Tet-On inducible expression system for the anhydrobiotic cell line, Pv11 / S. Tokumoto, Y. Miyata, K. Usui, R. Deviatiiarov, T. Ohkawa, S. Kondratieva, E. Shagimardanova, O. Gusev,

- R. Cornette, M. Itoh, Y. Hayashizaki, T. Kikawada // Insects. – 2020. – Vol. 11. – № 11. – P. 781.
184. Toxopeus, J. Group 1 LEA proteins contribute to the desiccation and freeze tolerance of *Artemia franciscana* embryos during diapause / J. Toxopeus, A. H. Warner, T. H. MacRae // Cell Stress & Chaperones. – 2014. – Vol. 19. – № 6. – P. 939-948.
185. Tunnacliffe, A. The continuing conundrum of the LEA proteins / A. Tunnacliffe, M. J. Wise // Die Naturwissenschaften. – 2007. – Vol. 94. – № 10. – P. 791–812.
186. Tyson, T. A molecular analysis of desiccation tolerance mechanisms in the anhydrobiotic nematode *Panagrolaimus superbus* using expressed sequenced tags / T. Tyson, G. O'Mahony Zamora, S. Wong, M. Skelton, B. Daly, J. T. Jones, E. D. Mulvihill, B. Elsworth, M. Phillips, M. Blaxter, A. M. Burnell // BMC Research Notes. – 2012. – Vol. 5. – P. 68.
187. Voronina, T. A. New group of transmembrane proteins associated with desiccation tolerance in the anhydrobiotic midge *Polypedilum vanderplanki* / T. A. Voronina, A. A. Nesmelov, S. A. Kondratyeva, R. M. Deviatiarov, Y. Miyata, S. Tokumoto, R. Cornette, O. A. Gusev, T. Kikawada, E. I. Shagimardanova // Scientific Reports. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 11633.
188. Walmagh, M. Trehalose analogues: latest insights in properties and biocatalytic production / M. Walmagh, R. Zhao, T. Desmet // International Journal of Molecular Sciences. – 2015. – Vol. 16. – № 6. – P. 13729–13745.
189. Wang, C. Towards decrypting cryptobiosis – analyzing anhydrobiosis in the tardigrade *Milnesium tardigradum* using transcriptome sequencing / C. Wang, M. A. Grohme, B. Mali, R. O. Schill, M. Frohme // PLOS ONE. – 2014. – Vol. 9. – № 3. – P. e92663.

190. Wang, L. RSeQC: quality control of RNA-seq experiments / L. Wang, S. Wang, W. Li // Bioinformatics. – 2012. – Vol. 28. – № 16. – P. 2184-2185.
191. Watanabe, M. Anhydrobiosis in invertebrates / M. Watanabe // Applied Entomology and Zoology. – 2006. – Vol. 41. – P. 15–31.
192. Watanabe, M. Mechanism allowing an insect to survive complete dehydration and extreme temperatures / M. Watanabe, T. Kikawada, N. Minagawa, F. Yukihiko, T. Okuda // The Journal of Experimental Biology. – 2002. – Vol. 205. – № Pt 18. – P. 2799–2802.
193. Watanabe, M. Physiological changes leading to anhydrobiosis improve radiation tolerance in *Polypedilum vanderplanki* larvae / M. Watanabe, Y. Nakahara, T. Sakashita, T. Kikawada, A. Fujita, N. Hamada, D. D. Horikawa, S. Wada, Y. Kobayashi, T. Okuda // Journal of Insect Physiology. – 2007. – Vol. 53. – № 6. – P. 573–579.
194. Watanabe, M. Biological effects of anhydrobiosis in an African chironomid, *Polypedilum vanderplanki* on radiation tolerance / M. Watanabe, T. Sakashita, A. Fujita, T. Kikawada, D. D. Horikawa, Y. Nakahara, S. Wada, T. Funayama, N. Hamada, Y. Kobayashi, T. Okuda // International Journal of Radiation Biology. – 2006. – Vol. 82. – № 8. – P. 587–592.
195. Welch, A. Z. TOR and RAS pathways regulate desiccation tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* / A. Z. Welch, P. A. Gibney, D. Botstein, D. E. Koshland // Molecular Biology of the Cell. – 2013. – Vol. 24. – № 2. – P. 115-128.
196. Wharton, D. A. Anhydrobiosis / D. A. Wharton // Current Biology. – 2015. – Vol. 25. – № 21. – P. R1114–R1116.
197. Wharton, D. A. Freezing survival and cryoprotective dehydration as cold tolerance mechanisms in the Antarctic nematode *Panagrolaimus*

- davidi / D. A. Wharton, G. Goodall, C. J. Marshall // Journal of Experimental Biology. – 2003. – Vol. 206. – № Pt 2. – P. 215-221.
198. Wharton, D. A. A surface lipid may control the permeability slump associated with entry into anhydrobiosis in the plant parasitic nematode *Ditylenchus dipsaci* / D. A. Wharton, L. Petrone, A. Duncan, A. J. McQuillan // Journal of Experimental Biology. – 2008. – Vol. 211. – № 18. – P. 2901-2908.
199. Wilson, C. G. Anciently asexual bdelloid rotifers escape lethal fungal parasites by drying up and blowing away / C. G. Wilson, P. W. Sherman // Science. – 2010. – Vol. 327. – № 5965. – P. 574-576.
200. Wise, M. J. POPP the question: what do LEA proteins do? / M. J. Wise // Trends in Plant Science. – 2004. – Vol. 9. – № 1. – P. 13–17.
201. Wise, M. J. POPP the question: what do LEA proteins do? / M. J. Wise, A. Tunnacliffe // Trends in Plant Science. – 2004. – Vol. 9. – № 1. – P. 13–17.
202. Wolfe, J. Hydration, dehydration, and the stresses and strains in membranes / J. Wolfe, M. F. Dowgert, B. Maier, P. L. Steponkus // In: A. C. Leopold. Membranes, Metabolism and Dry Organisms. – 1986. – P. 283–307.
203. Womersley, C. Z. Biochemical and physiological aspects of anhydrobiosis / C. Z. Womersley // Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. – 1981. – Vol. 70. – № 4. – P. 669–678.
204. Wright, J. C. Desiccation tolerance and water-retentive mechanisms in tardigrades / J. C. Wright // Journal of Experimental Biology. – 1989. – Vol. 142. – P. 267–292.
205. Wu, T. clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data / T. Wu, E. Hu, S. Xu, M. Chen, P. Guo, Z. Dai, T.

- Feng, L. Zhou, W. Tang, L. Zhan, X. Fu, S. Liu, X. Bo, G. Yu // Innovation. – 2021. – Vol. 2. – № 3. – P. 100141.
206. Wyatt, G. R. The chemistry of insect hemolymph. II. Trehalose and other carbohydrates / G. R. Wyatt, G. F. Kale // Journal of General Physiology. – 1957. – Vol. 40. – № 6. – P. 833–847.
207. Yamada, T. G. Identification of a master transcription factor and a regulatory mechanism for desiccation tolerance in the anhydrobiotic cell line Pv11 / T. G. Yamada, Y. Hiki, N. F. Hiroi, E. Shagimardanova, O. Gusev, R. Cornette, T. Kikawada, A. Funahashi // PLOS ONE. – 2020. – Vol. 15. – № 3. – P. e0230218.
208. Yamada, T. G. Transcriptome analysis of the anhydrobiotic cell line Pv11 infers the mechanism of desiccation tolerance and recovery / T. G. Yamada, Y. Suetsugu, R. Deviatiiarov, O. Gusev, R. Cornette, A. Nesmelov, N. Hiroi, T. Kikawada, A. Funahashi // Scientific Reports. – 2018. – Vol. 8. – № 1. – P. 17941.
209. Yoshida, Y. Deciphering the biological enigma—genomic evolution underlying anhydrobiosis in the phylum Tardigrada and the chironomid *Polypedilum vanderplanki* / Y. Yoshida, K. Ogasawara, T. Kunieda // Insects. – 2022. – Vol. 13. – № 6. – P. 557.
210. Yoshida, Y. High quality genome assembly of the anhydrobiotic midge provides insights on a single chromosome-based emergence of extreme desiccation tolerance / Y. Yoshida, N. Shaikhutdinov, O. Kozlova, M. Itoh, M. Tagami, M. Murata, H. Nishiyori-Sueki, M. Kojima-Ishiyama, S. Noma, A. Cherkasov, G. Gazizova, A. Nasibullina, R. Deviatiiarov, E. Shagimardanova, A. Ryabova, K. Yamaguchi, T. Bino, S. Shigenobu, S. Tokumoto, Y. Miyata, R. Cornette, T. G. Yamada, A. Funahashi, M. Tomita, O. Gusev, T. Kikawada // NAR Genomics and Bioinformatics. – 2022. – Vol. 4. – № 2. – P. lqac029.

211. Yu, G. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters / G. Yu, L. G. Wang, Y. Han, Q. Y. He // OMICS: A Journal of Integrative Biology. – 2012. – Vol. 16. – № 5. – P. 284-287.
212. Zhang, Z. Chromosome-condensed G1 phase yeast cells are tolerant to desiccation stress / Z. Zhang, G. R. Zhang // Microbial Cell. – 2021. – Vol. 9. – № 2. – P. 42-51.
213. Zhang, H. Mass spectrometry imaging for spatially resolved multi-omics molecular mapping / H. Zhang, K. H. Lu, M. Ebbini, P. Huang, H. Lu, L. Li // npj Imaging. – 2024. – Vol. 2. – № 1. – P. 20.
214. Zhou, R. Acetylation of Chromatin-Associated Histone H3 Lysine 56 Inhibits the Development of Encysted Artemia Embryos / R. Zhou, F. Yang, D. F. Chen, Y. X. Sun, J. S. Yang, W. J. Yang // PLOS ONE. – 2013. – Vol. 8. – № 6. – P. e68374.
215. Ziv, T. Dormancy in embryos: insight from hydrated encysted gastrulae of *Artemia franciscana* / T. Ziv, M. Gurevitz, S. Rappaport // Frontiers in Physiology. – 2017. – Vol. 8. – P. 497.