

на правах рукописи

**Гусев Олег Александрович**

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

1.5.7. Генетика (биологические науки)

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Уфа - 2026

Работа выполнена в Институте биохимии и генетики – обособленном структурном подразделении Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук.

Официальные оппоненты: **Евгеньев Михаил Борисович**, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярных механизмов биологической адаптации Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН)»

**Янбаев Юлай Аглямович**, доктор биологических наук, профессор, заведующий научно-образовательного центра Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный аграрный университет»

**Тимофеев Максим Анатольевич**, доктор биологических наук, директор научно-исследовательского института биологии озера Байкал Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Иркутский государственный университет»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦИГ СО РАН), г. Новосибирск

Защита диссертации состоится 20 мая 2026 г. в «10.00» часов на заседании Диссертационного совета 24.1.218.01 при Уфимском федеральном исследовательском центре Российской академии наук по адресу: 450054, г. Уфа, пр. Октября, 71, конференц-зал ИБГ УФИЦ РАН (ком. № 406). С диссертацией можно ознакомиться на сайтах ВАК РФ (<https://vak.gisnauka.ru>) и УФИЦ РАН (<http://ufaras.ru>).

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

24.1.218.01

доктор биологических наук, доцент

Гульназ Фаритовна Корытина

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность и разработанность темы исследования

Ангидробиоз как уникальное физиологическое состояние рассматривается как модельная система для междисциплинарных исследований в биофизике, клеточной биологии, генетике и прикладной биотехнологии. Изучение данного феномена связано с разработкой подходов к стабильной фиксации биоматериалов и консервации клеток, а также с моделированием устойчивости к экстремальным условиям среды. Ангидробиоз возник конвергентно у представителей различных эволюционных линий, что указывает на высокую адаптивную значимость устойчивости к экстремальному обезвоживанию (Clegg et al., 2001; Rebecchi et al., 2007; Marks et al., 2025). Для разных таксонов характерны различные комбинации защитных механизмов, включая 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 выделяются два основных типа ангидробиоза. Индуцируемый ангидробиоз требует предварительной физиологической подготовки, например медленного высушивания или действия регуляторных факторов (Watanabe et al., 2006; Rebecchi et al., 2007; Tyson et al., 2012; Dupont et al., 2014). Конститутивный ангидробиоз встроен в онтогенез и не требует внешней активации, при этом набор защитных систем реализуется автоматически при высыхании (Rebecchi et al., 2007; Tyson et al., 2012; Hibshman et al., 2020).

Несмотря на существенное развитие молекулярных представлений об ангидробиозе, для ангидробиоза у насекомых сохраняется потребность в целостном описании геномной архитектуры, происхождения ключевых защитных модулей и принципов их регуляции. В этом контексте хирономиды рода *Polypedilum* обладают методологическими преимуществами, так как по сравнению с микрометазойными ангидробионтами являются более крупным объектом, что расширяет спектр экспериментальных задач (Mazin et al., 2018; Hinton et al., 1960). Актуальность усиливается наличием контрастных фенотипов устойчивости даже у близкородственных представителей рода. Вид *Polypedilum rembai* способен реализовывать феномен «сухого» состояния, аналогичного *P. vanderplanki* (Shaikhutdinov et al., 2023), тогда как *Polypedilum nubifer* демонстрирует классическую для насекомых чувствительность к дегидратации и не формирует «сухой» фазы в онтогенезе (Duchet et al., 2015).

Несмотря на значительный объём накопленных данных об ангидробиозе в различных модельных системах, сохраняется необходимость перехода от описания отдельных компонентов к построению причинно обоснованной модели, связывающей молекулярные механизмы и фенотипические проявления ангидробиоза. Существенное значение имеет анализ состава и организации семейств LEA-белков и ферментов трегалозного пути в связи со скоростью входа в ангидробиоз и полнотой восстановления после регидратации, а также сопоставление с филогенетически близкими видами, не демонстрирующими ангидробиоз, для выделения универсальных и специфических компонентов защитной программы. Дополнительным направлением является анализ кросс-устойчивости как инструмента выявления ключевых узлов регуляторной сети и формирования предпосылок к биотехнологическому применению. Настоящая работа направлена на изучение молекулярных и генетических основ ангидробиоза у *P. vanderplanki* с применением методов полногеномного анализа и постгеномных валидационных подходов.

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.

**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, репарация 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 паралогизированные 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 принимающий 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 работы**

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.** Используемые 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 ангидробиозу 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 ангидробиотическую 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 стандартизированных 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.

**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 результатов эволюции защитных механизмов, связанных с регулярной фрагментацией ядерной ДНК в цикле обезвоживания-регидратации.

3. Геном *P. vanderplanki* претерпел значительные изменения связанные с адаптацией к циклам обезвоживания-регидратации 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*.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Полученные результаты обеспечиваются 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, Оказати, 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, Оказати, 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 РФ (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 Агро-биологических 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.

**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 агро-биологических наук NARO.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали лабораторную колонию *Polypedilum vanderplanki*, поддерживаемую в стандартизированных условиях и подвергаемую инбридингу не менее четырёх поколений, перед отбором материала личинки выдерживали 24 часа без питания для снижения метаболической вариабельности. Параллельно применяли ангидробиотическую клеточную линию Pv11, культивируемую в среде IPL-41 с добавлением триптозофосфатного бульона, эмбриональной бычьей сыворотки и антибиотик-антимикотического комплекса, субкультивирование проводили еженедельно.

Дегидратацию личинок выполняли по протоколу (Watanabe et al., 2002) с размещением на фильтровальной бумаге в эксикаторе с силикагелем при относительной влажности ниже 5 % в течение 48 часов, что обеспечивало снижение содержания воды до 3–7 процентов массы, регидратацию проводили полным погружением в воду. Дегидратацию Pv11 осуществляли в два этапа с прекондиционированием в 0,6 М трегалозе и последующим высушиванием при относительной влажности ниже 10 процентов в течение 10 суток, регидратацию выполняли добавлением свежей полной среды. Для оценки перекрёстной устойчивости использовали физико-химические стрессоры, включая гиперосмотическую нагрузку NaCl или маннитом до 600 мМ.

Для Pv11 также применяли набор воздействий UVC, NaCl, маннит, трегалоза, паракват и тепловой шок.

Отдельный блок экспериментов включал экспозицию дегидратированных личинок на внешней поверхности МКС в рамках серии «Биориск» в течение 13 месяцев и в эксперименте «EXPOSE-R» с прямым воздействием солнечного УФ в течение 22 месяцев, с последующей регидратацией и оценкой жизнеспособности.

ДНК из личинок выделяли после гомогенизации с протеиназой К и фенол-хлороформной экстракции с контролем качества спектрофотометрически и электрофорезом, для Pv11 использовали колонковую схему на силикагелевой матрице. Тотальную РНК из личинок выделяли TRIzol с последующей очисткой на RNeasy и DNase-обработкой, интактность оценивали на Agilent 2100 Bioanalyzer, порог RIN не ниже 7.

Отбор выполняли по временным точкам (D-часы обезвоживания; R-часы регидратации), соответствующим дизайну RNA-seq, включая D0, D8, D16, D24 и R0.5, R2, R6, R24.

Библиотеки ДНК готовили на TruSeq DNA Sample Preparation v2 и секвенировали на Illumina GAIIx и HiSeq 2000, дополнительно использовали SOLiD 4 для улучшения равномерности покрытия и длинные чтения PacBio RS для закрытия разрывов, суммарное покрытие генома *P. vanderplanki* составило порядка x562. Сборку выполняли de novo с последующим улучшением и закрытием гэпов в PBJelly и валидацией стыков по концам фосмид, секвенированных методом Sanger.

Очищенные чтения выравнивали на хромосомную сборку Pv5.2 сплайс-осведомлёнными выравнивателями STAR и HISAT2 с контролем метрик мэппинга и strandedness в RSeQC, подсчёт на уровне генов выполняли

featureCounts, на уровне транскриптов использовали RSEM или Salmon. Кластеризацию экспрессионных профилей проводили после унификации и нормализации матриц счётов, для эволюционно-сопоставительного контекста строили ортогруппы в OrthoFinder с контролем полноты BUSCO. Функциональную интерпретацию осуществляли через GO с использованием clusterProfiler, множественную проверку гипотез выполняли по Бенджамини–Хохбергу, картирование на пути KEGG проводили по КО на основе BLAST или DIAMOND с последующей визуализацией в KEGG PATHWAY и KEGG Mapper.

Интеграцию метаболомных и транскриптомных данных выполняли на уровне путей с критериями биологической согласованности направлений изменений в локальных сетях, дополнительно анализировали лаговую согласованность временных рядов и формировали карты KEGG с наложением экспериментальных эффектов.

Трансфекцию Pv11 проводили на электропораторе NEPA21, локализацию рекомбинантных белков исследовали методом лазерной конфокальной микроскопии. Для анализа локализации использовали фьюжн-конструкции с AcGFP1 под контролем конститутивного промотора 121 *P. vanderplanki*.

Суммарную антиоксидантную ёмкость оценивали хемилюминесцентным методом на системе гипоксантин–ксантинооксидаза с детекцией МРЕС, анализ выполняли для гидратированного контроля и временных точек дегидратации и регидратации.

Числовые данные обрабатывали в GraphPad Prism. Результаты представляли как среднее  $\pm$  стандартное отклонение либо как среднее  $\pm$  95% доверительный интервал. Для парных сравнений применяли двусторонний *t* критерий Стьюдента при уровне значимости  $p < 0,05$ . При сравнении трёх и более групп использовали однофакторный или двухфакторный дисперсионный анализ с последующим пост хок тестом Тьюки при  $p < 0,05$ . Для сравнения распределений применяли двусторонний критерий Уилкоксона с поправкой на непрерывность, для множественных сравнений использовали корректировки, заложенные в соответствующие пост хок процедуры. Для метаболомных данных применяли однофакторный дисперсионный анализ с последующим попарным сравнением временных точек по критерию Фишера. В задачах транскриптомной валидации при множественных проверках гипотез применяли коррекцию по Бенджамини–Хохбергу и считали различия значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

### 1.1. Выживаемость личинок после космического полёта

В рамках российских космических программ выполнена серия экспериментов с ангидробиотическими личинками *Polypedilum vanderplanki*, направленная на оценку устойчивости многоклеточных организмов к условиям космоса. Исследования включали хранение образцов в герметичных отсеках на борту МКС в течение 30 и 210 суток, а также длительное экспонирование во внешней среде в специальных контейнерах, размещённых на внешней поверхности модуля «Пирс» (Рисунок 1), что обеспечивало воздействие факторов открытого космоса в полном объёме.

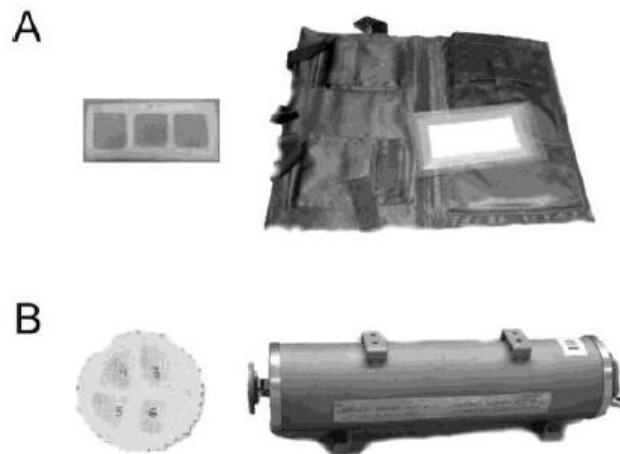


Рисунок 1. Упаковка ангидробиотических личинок *P. vanderplanki* для космических экспериментов: (А) внутреннее размещение на МКС (30 и 210 суток), (В) внешний контейнер эксперимента «БИОРИСК» (12, 24 и 48 месяцев).

Показано, что после 30 и 210 суток пребывания в герметичных отсеках МКС личинки сохраняли высокую жизнеспособность и после регидратации демонстрировали выживаемость, сопоставимую с наземным контролем. Дальнейшее развитие протекало без отклонений и включало прохождение всех стадий жизненного цикла, включая формирование жизнеспособного потомства.

Особое значение имел длительный эксперимент программы «БИОРИСК» при экспонировании личинок во внешнем контейнере на обшивке модуля «Пирс» МКС в течение 24 месяцев, когда образцы подвергались воздействию вакуума, температурных колебаний и космического излучения. Реактивация после

регидратации происходила в течение нескольких часов, дальнейшее развитие не отличалось от контроля.

## 1.2. Радиационная устойчивость в условиях «сухого» и «влажного» состояния

Сравнительный анализ действия ионизирующего излучения с различным линейным переносом энергии, низко LET  $\gamma$  квантов и высоко LET ионов гелия, показал различия в характере ДНК повреждений и динамике их репарации у гидратированных и ангидробиотических личинок *Polypedilum vanderplanki*.

По данным ДНК комет анализа клеток жирового тела после дозы 70 Гр у гидратированных личинок восстановление ДНК до уровня интактного контроля происходило в течение 24 часов при  $\gamma$  облучении, тогда как при облучении ионами  $^4\text{He}$  с  $\text{LET}_{\infty} = 16,2 \text{ кэВ/мкм}$  восстановление существенно замедлялось и возвращение к базовому уровню наблюдалось до 168 часов.

У необлученных «сухих» личинок сразу после регидратации регистрировалась выраженная фрагментация ДНК, сопоставимая с эффектом  $^4\text{He}$  при 70 Гр, при этом восстановление происходило быстрее и физиологическое состояние достигалось примерно через 96 часов (Рисунок 2).

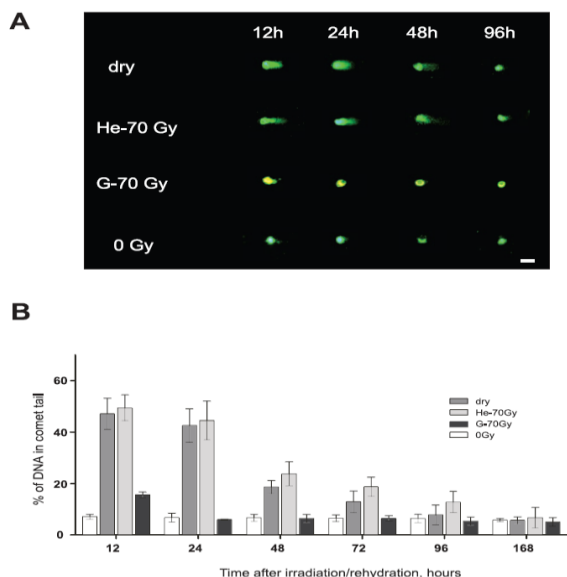


Рисунок 2. Динамика восстановления ДНК в клетках жирового тела гидратированных личинок после облучения ионами  $^4\text{He}^+$  и  $\gamma$  квантами, а также у личинок после регидратации после трёх месяцев ангидробиоза. (А) Репрезентативные изображения ДНК комет в течение 96 часов восстановления после  $\gamma$  облучения (70 Гр),  $^4\text{He}^+$  (70 Гр) и после ангидробиоза. (В) Доля ДНК в хвосте кометы после  $\gamma$  облучения или  $^4\text{He}^+$ , а также после регидратации. Погрешности представлены как среднее  $\pm$  95% ДИ

Полученные данные указывают, что ангидробиоз сопровождается массивными двуцепочечными разрывами ДНК, однако «сухое» состояние обеспечивает условия для последующей эффективной репарации после регидратации, при этом при длительном хранении в «сухом» состоянии до 14 месяцев при комнатной температуре дополнительного накопления ядерных повреждений не фиксируется.

Функционально это проявляется повышенной радиорезистентностью ангидробиотических личинок, устойчивость отмечается как при низко LET, так и при высоко LET излучении, проявляется уже при входе в ангидробиоз и сохраняется сразу после регидратации, при дозе 70 Гр вне зависимости от типа излучения не выявлено значимого ингибирующего эффекта на последующее развитие, что обосновывает использование 70 Гр как стандартной дозы для сравнительных молекулярных анализов.

### 1.3. Повреждения и защита ДНК при ангидробиозе и радиации

Электронно-микроскопический анализ показал, что переход личинок *Polypedilum vanderplanki* в ангидробиоз сопровождается выраженной перестройкой ядерной архитектуры в разных типах клеток. В «сухом» состоянии в клетках жирового тела и в скоплениях недифференцированных клеток отмечались конденсация и сегрегация хроматина, тогда как у гидратированных личинок хроматин сохранял дисперсное состояние. Дополнительно в сухих образцах фиксировались деформации и инвагинации ядерной оболочки, что согласуется с редукцией клеточного объёма при обезвоживании и ростом механической нагрузки на ядерный контур (Рисунок 3).

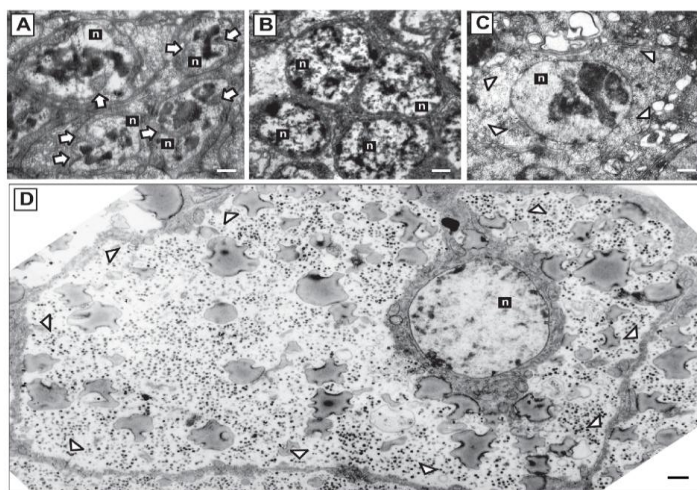


Рисунок 3. Ультраструктура ядер двух типов клеток у сухих и гидратированных личинок. (А) Недифференцированные клетки сухой личинки. (В) Недифференцированные клетки гидратированной личинки. (С) Клетки жирового тела сухой личинки. (D) Клетка жирового тела гидратированной личинки.

Сохранение признаков сегрегации хроматина в ранние сроки после регидратации можно рассматривать как элемент структурной «консервации» геномного аппарата, который позволяет выдерживать период отсутствия метаболизма ценой временного ограничения доступности ДНК для транскрипции и репликации. Такая более плотная упаковка, вероятно, снижает уязвимость двойной спирали в условиях стресса до момента запуска ферментативных путей репарации после восстановления водной фазы. В пользу этого сценария

свидетельствует отсутствие признаков массовой гибели клеток при постепенном сокращении «хвостов» ДНК-комет, что указывает на преобладание репарации над элиминацией повреждённых клеток.

Важным компонентом защиты генома при выходе из ангидробิโอ́за является контроль активных форм кислорода. По данным qRT-ПЦР, транскрипты *Cu Zn* супероксиддисмута́зы *Sod*, катала́зы *Cat* и глутатионпероксида́зы *Gpx Per* нараста́ли уже на стадии D-8 ч и достигали максимума на D-24–D-48 ч, примерно в 8–10 раз относительно гидратированного контроля. При регидратации *Sod* быстро возвращался к исходному уровню, тогда как *Cat* и *Per* нормализовались позднее, к R-12 ч. После  $\gamma$ -облучения у «влажных» личинок отмечался ранний транзиторный подъём экспрессии всех трёх генов с последующей нормализацией, тогда как после воздействия  $^4\text{He}$  значимых изменений транскриптов антиоксидантов не выявлялось. Функционально это сопровождалось ростом суммарной антиоксидантной активности в ходе дегидратации с максимумом в полностью «сухом» состоянии, примерно в 3–4 раза относительно контроля, и снижением к уровню контроля к R-24 ч. Дополнительно в «сухих» личинках детектировалась зрелая форма глутатионпероксида́зы по данным 2D-электрофореза и N-терминального секвенирования белка, что согласуется с накоплением антиоксидантных факторов в ангидробии́озе.

На уровне репарации ДНК выявлена согласованная активация генов распознавания повреждений и гомологичной рекомбинации. Экспрессия *Rad23* и *Rad51* повышалась при всех трёх воздействиях, то есть при ангидробии́озе,  $\gamma$ - и  $^4\text{He}$ -облучении. При высоко-LET облучении  $^4\text{He}$  уже через 1 час фиксировалось увеличение экспрессии *Rad23* примерно в 8 раз и *Rad51* более чем в 25 раз, причём повышение сохранялось не менее 48 часов. Для  $\gamma$ -квантов пик экспрессии наступал позже, примерно через 3 часа, и быстрее снижался. В условиях ангидробии́оза *Rad23* повышался в ходе дегидратации, тогда как *Rad51* достигал максимума через 3 часа после регидратации, что соответствует необходимости устранения накопленных разрывов ДНК после восстановления водной фазы и реактивации ферментативных систем репарации.

Для функциональной валидации фенотипа устойчивости к прямому повреждению ДНК была проведена оценка выживаемости сухих и влажных личинок *P. vanderplanki* и чувствительного к обезвоживанию близкородственного вида *P. nubifer* после УФ-облучения в контрольные точки времени (Рисунок 4).



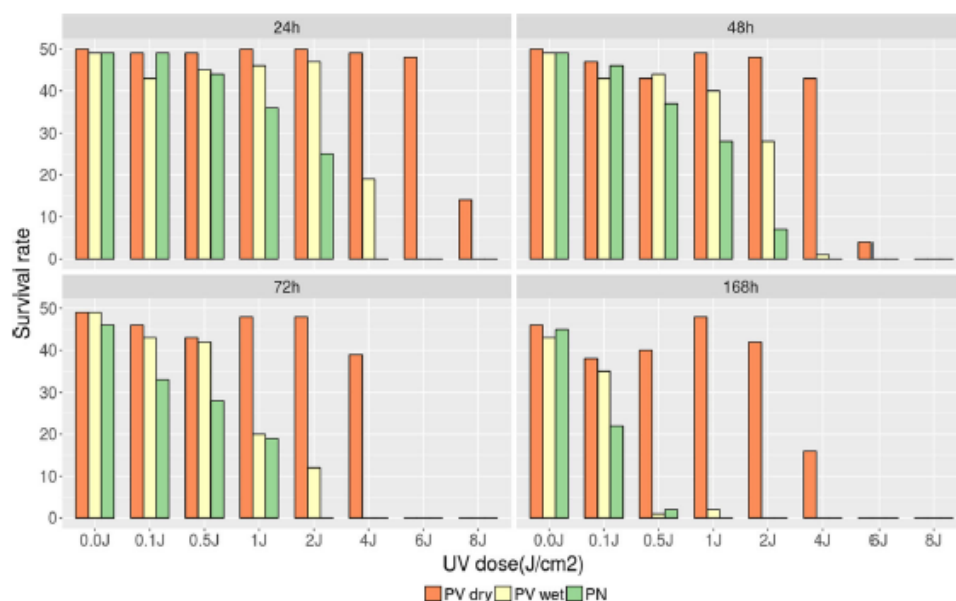


Рисунок 4. Выживаемость личинок сухих/влажных *P. vanderplanki* и *P. nubifer* после различных доз УФ-облучения в контрольные точки времени.

Помимо транскрипционных ответов антиоксидантной системы и репарации, показано, что белки ангидробии способны напрямую стабилизировать ДНК. Для проверки гипотезы о прямом взаимодействии LEA-белка с ДНК выполнен плазмидный тест. Плазмиду pсDNA5 FRT облучали УФ-светом в диапазоне 0,5–2 Дж см<sup>2</sup> *in vitro* в присутствии или отсутствии белков, затем трансформировали *E. coli* и оценивали число колоний как индикатор сохранности ДНК. В контроле без белков наблюдалась дозозависимая утрата целостности плазмиды, при дозах выше 1 Дж см<sup>2</sup> рост трансформантов практически отсутствовал. При дозе 1,25 Дж см<sup>2</sup> добавление БСА давало единичные колонии, тогда как добавление рекомбинантного PvLEA4 обеспечивало появление 42 колоний при той же дозе, при полном отсутствии колоний в контроле без белка. Эти результаты демонстрируют самостоятельную ДНК-стабилизирующую активность PvLEA4 и снижение УФ-индуцированной деградации молекулы ДНК.

#### Заключение по разделу 1 результатов

Показано, что ангидробиотические личинки *Polypedilum vanderplanki* сохраняют жизнеспособность и репродуктивный потенциал после длительных экспозиций в условиях космического полёта, включая открытый космос, что подтверждает сохранность онтогенетических программ при действии комплекса экстремальных факторов. Устойчивость основана не на полном предотвращении повреждений, а на их переносимости с последующим эффективным

восстановлением. В ангидробиозе фиксируется фрагментация ДНК, однако после регидратации запускается ускоренная репарация, причём кинетика восстановления зависит от водного статуса и типа излучения с разным LET, а «сухие» личинки более радиоустойчивы, чем гидратированные.

Данные электронной микроскопии указывают на конденсацию и сегрегацию хроматина и деформации ядерной оболочки в «сухом» состоянии, что согласуется с моделью структурной консервации генома на период аметаболизма. На транскриптомном и биохимическом уровнях выявлена преадаптация антиоксидантной системы, включающая индукцию *Sod*, *Cat*, *Gpx/Per* и рост суммарной антиоксидантной активности при дегидратации. В репарационных контурах показаны раннее распознавание повреждений и активация гомологичной рекомбинации в первые сроки после восстановления водной фазы, что соответствует стратегии «перенести и восстановить».

Дополнительный вклад в защиту вносят белки ангидробиоза, включая PvLEA4, способный стабилизировать ДНК *in vitro* и повышать устойчивость к УФ-повреждениям. В целом интегративная модель включает структурную консервацию хроматина, опережающую антиоксидантную преадаптацию, переносимость повреждений ДНК в «сухом» состоянии и ускоренную репарацию после регидратации, что обеспечивает устойчивость *P. vanderplanki* к экстремальным стрессорам при сохранении полного жизненного цикла.

## **2. Расшифровка генома *Polypedilum vanderplanki* и характеристики генома**

### **2.1. Общие черты геномной организации *Polypedilum***

Для анализа молекулярной природы ангидробиоза выполнено сопоставление геномов ангидробиотического вида *P. vanderplanki* и близкородственного десикационно чувствительного *P. nubifer*. Для обоих видов характерны небольшой размер генома, высокая доля аденина и тимина и низкое содержание известного репетитивного материала, включая транспозоны.

Прогнозируемое число белок кодирующих локусов составило 17 137 для *P. vanderplanki* и 16 553 для *P. nubifer*, при этом полнота сборок подтверждена покрытием ядра эукариотических генов по BUSCO и CEGMA.

На этом этапе введена концепция кластеров ангидробиоза ARId, которые представляют собой участки генома с группировкой генов, активируемых при дегидратации и регидратации. К ARId отнесены, в частности, семейства LEA белков, тиоредоксинов, гемоглобинов и L изоаспартил O метилтрансфераз.

Принципиально важно, что в геноме *P. nubifer* участки, удовлетворяющие критериям ARId, отсутствуют.

## **2.2. Хромосомная организация и особая роль 4-й хромосомы**

Улучшение сборки *P. vanderplanki* до хромосомного уровня Pv5.2 позволило перейти к четырём хромосомам и углубить функциональную интерпретацию. Аннотированный набор включает 18 989 генов и 65 981 транскрипт, качество аннотации подтверждено BUSCO 95,7% и 98,3%. Карта контактов Hi C поддерживает корректность сборки и позволяет локализовать теломерные участки.

На фоне хромосомной карты выделяется chr4, которая отличается пониженным содержанием GC в кодирующих последовательностях 31,5% против около 34% на chr1–chr3 и повышенной нуклеотидной дивергенцией п.

На chr4 локализуется большинство ранее описанных ARId, из девяти островов семь приходятся на эту хромосому, также она обогащена видоспецифичными генами и характеризуется признаками ускоренной молекулярной эволюции, включая повышенное отношение dN dS.

В совокупности это соответствует представлению о chr4 как о специализированной области генома с повышенной вариабельностью и функциональной направленностью на устойчивость к ангидробиозу.

Дополнительная поддержка функциональной специализации chr4 получена при анализе мультикопийных кластеров, в том числе семейства генов ионотропных рецепторов, демонстрирующего дивергенцию и признаки псевдогенизации. При этом доменная разметка по Dfam указывает, что крупнейшая группа генов chr4 не связана с мобильными элементами, что говорит в пользу расширения семейства не за счёт прямой мобилизации транспозонов.

Цитогенетические данные согласуются с геномными наблюдениями. У *P. vanderplanki* диплоидный набор равен 8, а 4-я хромосома морфологически выделяется наличием крупных колец Бальбиани, что соответствует усиленной транскрипции в политетенных хромосомах и согласуется с концентрацией на chr4 ARId и стресс ассоциированных генов.

Визуализация крупномасштабной организации генома с отображением ARId, вариабельности АТ содержания, генной плотности и блоков коллинеарности приведена на Рисунке 5.

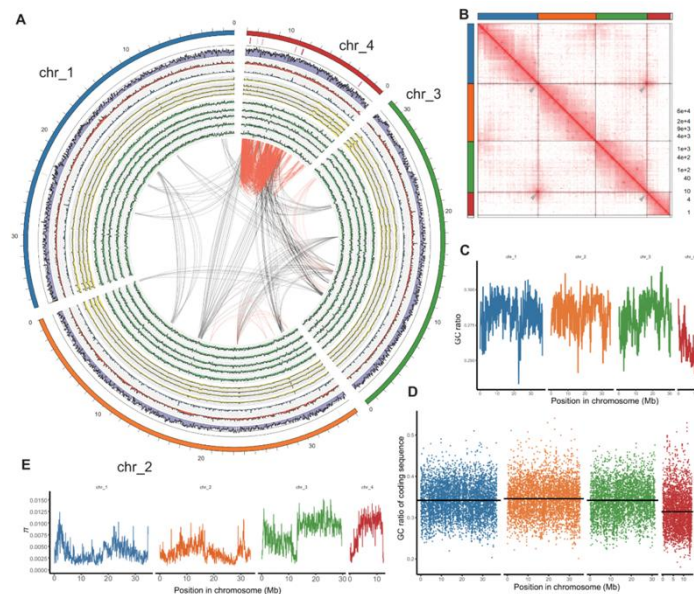


Рисунок 5. Сборка генома *Polypedilum vanderplanki* в масштабе хромосом. (A) Circos диаграмма для четырёх хромосом, показаны регионы ARId, доля AT%, генная и некодирующая плотность в окнах 50 кб, покрытие Illumina DNA seq и RNA seq, а также коллинеарные блоки MCScanX. (B) Контактная карта Hi C, серые стрелки обозначают предполагаемые теломерные области. (C) Доля GC в окнах 100 кб. (D) Доля GC в кодирующих последовательностях, чёрные линии показывают средние значения по хромосомам. (E) Парное нуклеотидное разнообразие  $\pi$  в окнах 50 кб.

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

Семейство PIMT, кодирующее L-изоаспартил-O-метилтрансферазы, представляет ключевой пример направленной эволюции защитных генов у *Polypedilum vanderplanki*. Эти SAM-зависимые ферменты участвуют в восстановлении повреждённых белков, а их транскрипция у ангидробактериотов усиливается при дегидратации и регидратации. Сравнительный анализ выявил 14 паралогов PIMT у *P. vanderplanki* и 19 у *P. pembai*.

Наиболее выраженное межвидовое отличие связано с кластером PIMT4. У *P. pembai* сформирован тандем из шести копий PIMT4 (PIMT4-1–PIMT4-6) в том же геномном окружении, где у *P. vanderplanki* сохраняется одиночный PIMT4. В расширенном участке у *P. pembai* выявлены признаки недавнего положительного отбора, включая редукцию полиморфизма, высокий вклад фиксированных адаптивных замен по тесту Макдональда—Крайтмана ( $\alpha$  около 0,69) и сигнал отбора в codeml для группы недавно дуплицированных копий (оценка около 1,5), при преобладании очистительного отбора в остальной части семейства.

Экспрессионные данные указывают на функциональную неоднородность копий. «Родительская» PrPIMT4-1 максимальна на поздней стадии дегидратации D48, тогда как новые дубликаты проявляют более умеренную активность, сходные закономерности отмечены и для пары Pv/PrPIMT12. Это согласуется с частичной неофункционализацией при сохранении «мастер-копии» как основного драйвера ответа, а не с простой дозовой моделью. Амплификации аналогичного масштаба не выявлены для других типичных семейств ARId, включая TRX, Hb и LEA.

В целом PIMT представляет пример «точечной» паралогизации с признаками направленного отбора в линии *P. rembai*, вероятно связанной с условиями повторяющихся циклов «высыхание—реидратация». Дополнительно отмечена повышенная дифференциация на значительной части хромосомы 4, что согласуется с её ролью как области ускоренных адаптивных изменений.

#### **2.4. Размер генома у хирономид, интронная компактность**

На уровне семейства Chironomidae выявлены «миниатюрные» геномы с узким диапазоном значений 0,07–0,20 пг ДНК, что соответствует примерно 68–195 Мб и характерно для *P. vanderplanki* и *P. nubifer*. Компактный геном является общей чертой хирономид и формирует фон, благоприятный для сравнительно-геномных исследований, включая оценку вклада повторов и длины интронов, а также корректное сопоставление геномных сборок у видов рода *Polypedium*.

#### **2.5. Митохондриальный геном, состав и возможные следы адаптации**

Митохондриальный геном *P. vanderplanki* имеет длину 16 060 п. н. при низком содержании GC 20,6% и включает 13 белок-кодирующих генов, 2 рРНК и 22 тРНК. Его особенностью является укороченная богатая АТ контрольная область и наличие 29 межгенных спейсеров длиной 1–171 п. н. Такая архитектура рассматривается как возможная адаптация к регулярной полной дегидратации личинок и циклам «высыхание—реидратация».

#### *Заключение по разделу 2 результатов*

В совокупности данные указывают на несколько взаимодополняющих уровней геномной адаптации к ангидробиозу. Для хирономид характерна «минималистская» архитектура генома, включающая малый размер, укороченные интроны и низкую представленность мобильных элементов, что формирует компактную организацию и может способствовать быстрой адаптации к биотопам с неустойчивым доступом к воде.

На этом фоне у *P. vanderplanki* формируется хромосомная специализация, связанная с 4-й хромосомой, которая отличается пониженной долей GC,

повышенной вариабельностью и концентрацией ARId и быстро эволюционирующих, часто видоспецифичных генов. В пределах участков высокой пластичности возможны направленные дубликации отдельных защитных генов, что показано на примере кластера PIMT4 у *P. pembai*, характеризующегося тандемной амплификацией, сигнатурами недавнего положительного отбора и сохранением функционально активной «якорной» копии.

Дополнительный уровень возможной адаптации отражён в организации митохондриального генома *P. vanderplanki*, который при типичном наборе белок-кодирующих и РНК генов отличается короткой богатой АТ контрольной областью и наличием множества межгенных спейсеров. В целом результаты сравнительных сборок, хромосомного референса и популяционной геномики показывают, что ангидробиоз у *Polypedilum* обеспечивается сочетанием минималистской организации генома, специализации целой хромосомы как площадки ускоренной эволюции и точечных, но функционально значимых амплификаций защитных генов, формирующих пространственно организованные наборы, эволюционирующие в условиях повторяющихся циклов обезвоживания и регидратации.

### **3. Кластеризация и амплификация генов как элемент адаптации к ангидробиозу**

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

Геномный анализ *Polypedilum vanderplanki* выявил компактные кластеры генов, ассоциированных с ангидробиозом, ARIds. Эти участки характеризуются повышенной плотностью паралогов, вовлечённых в устойчивость к обезвоживанию, и отражают видоспецифическую геномную организацию. У *P. nubifer* ARId по заданным критериям не выявляются, а ключевые защитные семейства представлены преимущественно одиночными копиями, что поддерживает связь кластерной архитектуры с ангидробиозом.

Показательным примером служит семейство PvLea. Из 27 генов 26 локализованы в двух кластерах ARId1 и ARId2, при этом при дегидратации экспрессия 23 генов возрастает более чем в три раза. Такая концентрация и согласованная индукция подчёркивают значимость не только состава семейства, но и его пространственной организации.

В пределах ARId1 обнаружено чередование блоков PvLea с генами новой группы PvLil, тандемно встроенными между копиями PvLea и образующими

единую протяжённую структуру. Такая конфигурация согласуется с моделью координированной регуляции функционально комплементарных компонентов защитной программы. Филогенетически PvLil близки к подсемейству PvLea1/3, а карта локализации PvLea и PvLil в интервале 27 300–98 100 нуклеотидов приведена в виде схемы региона.

В целом ARId можно рассматривать как эволюционно сформированные модули, объединяющие тандемные дупликации и физическую ко-локализацию семейств, активируемых в ключевые временные окна дегидратации и регидратации. Отсутствие аналогичной организации у *P. nubifer* поддерживает интерпретацию ARId как одной из геномных «подписей» ангидробиоза у африканских хирономид.

Аналогичная логика прослеживается для семейства PIMT. Если у большинства животных *Pimt* представлен одной копией, то у *P. vanderplanki* идентифицировано 15 паралогов, локализованных в пределах ARId. Их распределение между кластерами ко-экспрессии указывает на фазовую специализацию отдельных копий в ходе стресс-цикла, а профили экспрессии SAM-зависимых метилтрансфераз и PvPimt сопоставлены (Рисунок 6).

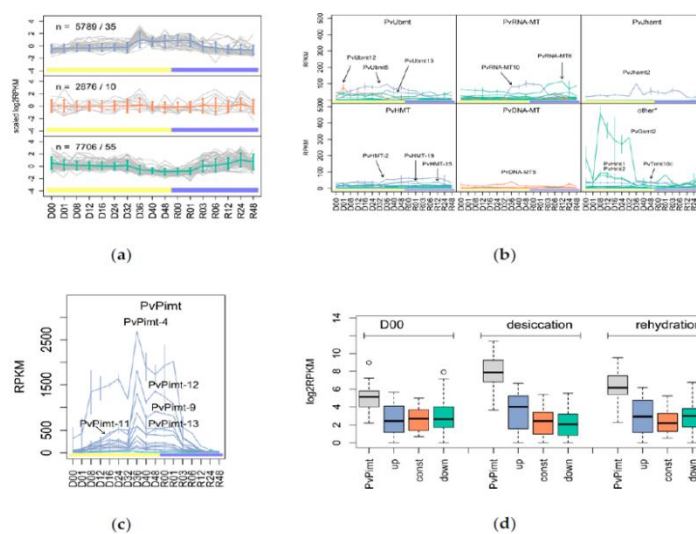


Рисунок 6. Профили экспрессии SAM-зависимых метилтрансфераз у личинок *Polypedilum vanderplanki* при дегидратации (жёлтый) и регидратации (синий). (А) Кластеризация методом SOM с выделением трёх групп по направлению транскрипционного ответа, n, число генов в группе. (В, С) Сводные уровни экспрессии типов метилтрансфераз в выделенных группах. (D) Динамика экспрессии генов PvPimt в сопоставлении с кластерами ко-экспрессии. Временные точки (в часах): D00 контроль, D01–D48 дегидратация, R00–R48 регидратация.

Межвидовое сравнение выявило направленную перестройку локуса PIMT у *P. rembai* за счёт амплификации подсемейства PIMT4. У *P. vanderplanki*

присутствует одиночная копия PvPIMT4, тогда как у *P. pembai* в том же геномном окружении сформирован тандем из шести паралогов при сохранении синтении.

Удлинение локуса объясняется вставкой дополнительных копий, равномерное покрытие секвенированием исключает сборочные артефакты, а популяционные данные указывают на снижение нуклеотидного разнообразия в области новых копий, что интерпретируется как след недавнего селективного сканирования. Экспрессионно все 19 паралогов PIMT у *P. pembai* дифференциально экспрессируются при обезвоживании, при этом максимум транскрипции характерен для якорной копии PpPIMT4-1 на 48 часу дегидратации. Специфичность амплификации подчёркивается тем, что для других ключевых семейств ARId сопоставимых расширений у *P. pembai* не выявлено. При этом у *P. vanderplanki* в стандартных условиях каталитическую активность сохраняют только PIMT1 и PIMT2, тогда как значительная часть остальных паралогов утратила каноническую SAM-зависимую метилтрансферазную функцию, что согласуется с идеей дивергенции копий и переразметки их ролей в контуре ангидробиоза.

### **3.2. Паралогическое разнообразие и экспрессия LEA-белков**

В геноме *Polypedilum vanderplanki* идентифицировано 27 генов семейства PvLea, относящихся к группе 3 LEA-белков. Анализ аминокислотных последовательностей и филогенетическая реконструкция выделили подгруппы структурно близких паралогов. Основной повторяющийся элемент соответствует 11-мерному мотиву LEA\_4 (PF02987), при этом число повторов варьирует от 0–2 у коротких белков до 6–14 у наиболее протяжённых, что отражает выраженную структурную диверсификацию и потенциальные различия биофизических свойств.

Экспрессия PvLea у личинок характеризуется стадийной динамикой в ходе дегидратации и регидратации. Для большинства паралогов отмечена индукция в разные временные «окна» стресс-цикла, что согласуется с функциональной специализацией по фазам ангидробиоза.

Клеточная линия Pv11 в целом воспроизводит ответ *in vivo*. За исключением PvLea16 и PvLea17, экспрессия остальных генов семейства регистрируется в Pv11, и большинство паралогов индуцируется в стандартном протоколе трегалоза, дегидратация, регидратация, часто с максимумом на 24-м часе индукции. Ранговые уровни экспрессии в Pv11 и у личинок хорошо согласуются, при отдельных различиях, включая сниженный уровень PvLea4 в Pv11 и



повышенную базальную экспрессию PvLea7, PvLea10, PvLea20 и PvLea27 в контроле (Рисунок 7).

Дополнительно выявлена ассоциация между числом LEA\_4-мотивов и уровнем транскрипции в ряде условий, включая контроль, 48 часов после обработки трегалозой и 24 часа после регидратации. В целом паралоги с большим числом 11-мерных повторов демонстрируют более высокую экспрессию, что поддерживает гипотезу согласованности между «структурным кодом» LEA-белков и регуляторным ответом на стресс и указывает на возможную коэволюцию структурных и регуляторных характеристик в рамках специализации паралогов.

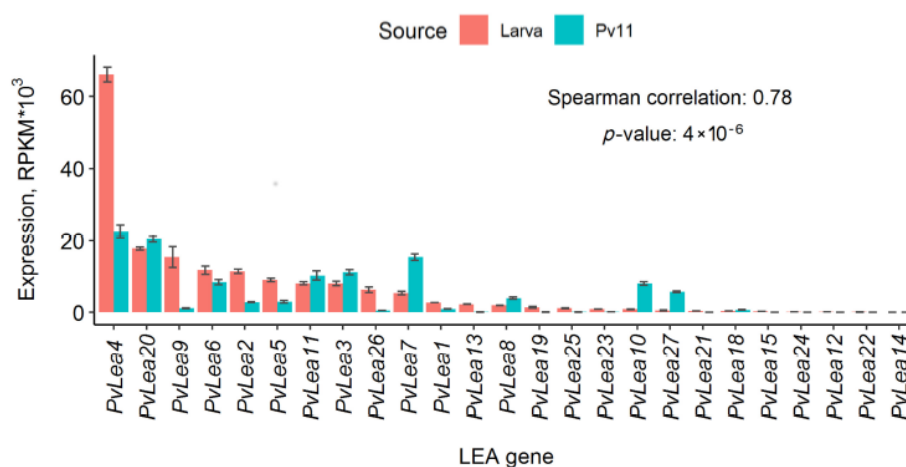


Рисунок 7. Экспрессия генов PvLea у личинок *P. vanderplanki* и в клетках Pv11 через 24 ч после индукции ангидробии. Уровни экспрессии представлены в RPKM, столбцы отражают среднее по биологическим повторам, вертикальные линии показывают стандартное отклонение. Красным цветом показаны личинки, синим зеленым показаны клетки Pv11. Гены упорядочены по убыванию экспрессии у личинок.

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

В составе ARId1 у *Polypedilum vanderplanki* идентифицирована ранее не описанная группа генов LIL (LEA-Island Located), тандемно встроенная между блоками PvLea. Всего выявлено 13 генов PvLil (PvLIL1–PvLIL13), формирующих компактный кластер, специфичный для *P. vanderplanki* и отсутствующий у близкородственного *P. nubifer*.

Биоинформатический анализ показал, что белки PvLIL принципиально отличаются от классических LEA-белков. Они более гидрофобны,

преимущественно находятся в свёрнутом состоянии и характеризуются положительными значениями GRAVY и FoldIndex.

Для всех PvLIL предсказано наличие нескольких трансмембранных доменов, а типовая топология показана на примере PvLIL10. Мембранная локализация подтверждена экспериментально для PvLIL1, PvLIL2 и PvLIL10 в клеточной линии Pv11 при экспрессии химер PvLIL–AcGFP. Множественное выравнивание выявило 15 полностью консервативных позиций, сосредоточенных преимущественно в трансмембранных сегментах и прилежащих областях. Первый внеклеточный участок наиболее вариабелен, при этом содержит две консервативные цистеиновые позиции, потенциально связанные с формированием дисульфидной связи, а распределение мотивов и доменов приведено. Классический 11-мерный мотив LEA\_4 (PF02987) в PvLIL практически отсутствует, за частичным исключением PvLIL12. Сходство PvLIL и PvLEA ограничено не-LEA-сегментами, представленными у PvLEA1 и PvLEA3, где также выявлены трансмембранные участки с общностью происхождения с LIL-доменами. Это позволяет рассматривать PvLEA1 и PvLEA3 как химерные белки, соединяющие растворимый LEA-компонент и трансмембранные элементы LIL-типа (Рисунок 8).



Рисунок 8. Сходство белков PvLIL с PvLEA и распределение предсказанных мотивов. (А) Множественное выравнивание 13 белков PvLIL и 3 белков PvLEA, сходство ограничено N концом PvLEA1 и С концом PvLEA3. (В) Мотивный состав белков PvLIL и PvLEA1–PvLEA8, показаны до 10 мотивов длиной до 22 аминокислот, цветные блоки отражают мотивы и их значимость. Для PvLEA9–PvLEA27 преобладает 1–4 мотива типа 1, PvLEA22 без мотива типа 1.

Экспериментально показано, что PvLEA1 преимущественно ассоциирован с плазматической мембраной, тогда как PvLEA3 локализуется в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи, что подчёркивает наличие функционального моста между растворимым LEA-контуром и мембранным LIL-контуром. Транскриптомный анализ показал индукцию PvLil при инициации ангидробии как у личинок, так и в клеточной линии Pv11, при этом для личиночной стадии зафиксирован повышенный уровень экспрессии по сравнению с другими фазами жизненного цикла.

Для PvLil4 выявлена альтернативная сплайс-форма с удержанием 42-нуклеотидного интрона и укорочением N-концевого участка одной из изоформ, при сохранении рамки считывания и наличии потенциальных старт-кодона, что указывает на возможную изоформ-специфическую регуляцию.

### Закключение по разделу 3 результатов

Совокупность данных позволяет рассматривать устойчивость *Polypedilum vanderplanki* к дегидратации как результат согласованной работы нескольких комплементарных молекулярных модулей, объединённых общей регуляторной

архитектурой ARId-кластеров. Растворимый гидрофильный компонент, представленный паралогами LEA, обеспечивает стабилизацию макромолекул в критические периоды обезвоживания и восстановления. Мембранный компонент, включающий LIL-белки и трансмембранные формы LEA, поддерживает структурную целостность и функциональную организацию клеточных мембран и органелл. Ферментативный модуль, ассоциированный с PIMT и другими SAM-зависимыми метилтрансферазами, реализует постстрессовую коррекцию, включая восстановление повреждённых белков и поддержание протеостаза, преимущественно на поздних стадиях дегидратации и в фазе регидратации.

Координация модулей обеспечивается их геномной ко-локализацией в пределах ARId и согласованной транскрипционной динамикой. Временные «окна» экспрессии паралогов распределены так, чтобы перекрывать ключевые фазы цикла «обезвоживание — регидратация», а субклеточная локализация белков обеспечивает пространственное разделение функций. В результате формируется многоуровневая защитно-восстановительная система, объясняющая воспроизводимость феномена ангидробиоза в разных экспериментальных системах и межвидовые различия при сохранении общей сетевой логики.

#### **4. Полногеномный анализ экспрессии генов**

##### **4.1. Глобальная динамика экспрессии и регуляторная архитектура ангидробиоза**

Для молекулярной декомпозиции ангидробиоза на уровне клеток использована линия Pv11, полученная из эмбрионов *P. vanderplanki*. Десикационная устойчивость в Pv11 индуцируется 48-часовой экспозицией 600 мМ трегалозы с последующей регидратацией и возобновлением пролиферации.

Транскриптомное профилирование Pv11 выполнено методом CAGE-seq и охватило шесть состояний. Контроль без трегалозы T0, преэкспозиция трегалозой 48 ч T48, ранняя и глубокая десикация D8 и D10d, ранняя и поздняя регидратация R3 и R24. Для сопоставления с ответом *in vivo* проанализированы EST-библиотеки личинок *P. vanderplanki* для трёх временных точек pvD00, pvD12, pvD36, всего 15 056 EST, сгруппированных в 4 807 кластеров. По данным реконструкции регуляторных сетей на расширенном RNA-seq Pv11 верхний узел сети соответствует транскрипционному фактору NF-YC. Через контуры положительной обратной связи он активирует и поддерживает включёнными ключевые блоки ответа на десикацию, стабилизируя состояние ангидробиоза.

Иерархическая кластеризация показала максимальное расхождение экспрессионных профилей в сухом состоянии D8 и D10d с последующим поэтапным сближением с контролем при регидратации от R3 к R24 (Рисунок 9).

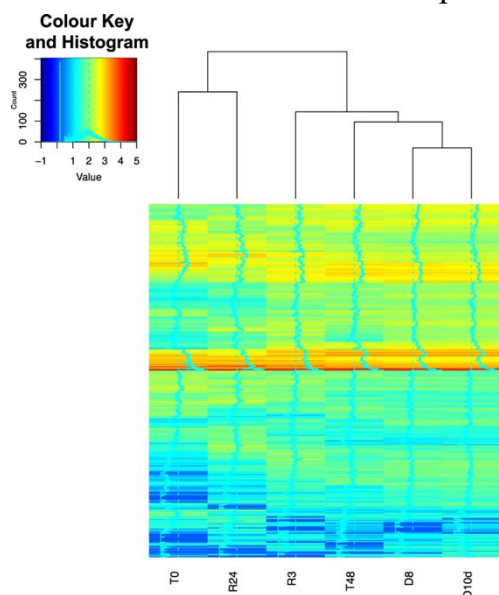


Рисунок 9. Иерархическая кластеризация образцов по TPM. Во вставке показаны распределение  $\log_{10}(\text{TPM} + \text{минимальное ненулевое TPM})$  и число дифференциально экспрессируемых генов; учтены гены, дифференциально экспрессируемые хотя бы в одном парном сравнении

По числу дифференциально экспрессируемых генов при  $\text{FDR} < 0,05$  выделены контрасты T0 и T48, 384 гена, T0 и D8, 813 генов, T0 и D10d, 974 гена. Между D8 и D10d достоверных различий не выявлено, что указывает на стабилизацию аметаболического плато.

GO-анализ для перехода T0 к T48 выявляет раннюю метаболическую перестройку с преобладанием процессов метаболизма и редокс-активности, что соответствует фазе подготовки к десикации. Сопоставление *P. vanderplanki* и чувствительного вида *P. nubifer* показывает, что ядро ответа в устойчивой линии включает LEA, TRX, PIMT, а также Hb, Aqr и компоненты трегалозного пути, тогда как у *P. nubifer* сопоставимое включение этих программ не наблюдается и отсутствуют гомологи ряда ключевых стресс-ассоциированных генов.

#### 4.2. Эффекторные модули ангидробиоза, «ядро» генов и процессы

Преэкспозиция трегалозой при переходе от T0 к T48 сопровождается согласованной индукцией антиоксидантных и детоксификационных систем, включая тиоредоксины PvTrx1-1, PvTrx3, PvTrx7 и PvTrx10, а также глутатион S трансферазы, УДФ глюкуронозилтрансферазы и карбоксилэстеразы. Одновременно активируются процессы контроля качества РНК. В фазе десикации D8 и D10d наблюдается двунаправленный сдвиг, при котором усиливаются протеостатические программы и одновременно подавляется активность трансляционного аппарата. К ключевым компонентам ответа относятся LEA белки и белки семейства HSP, выполняющие защитную функцию,

а также PIMT метилтрансферазы, вовлечённые в восстановление белков с изоаспартил-повреждениями.

На уровне транспорта и углеводного метаболизма выявлен согласованный ответ клеточной модели и личинок. У личинок индуцируются ферменты синтеза трегалозы TPS и T6PP и переносчик Tret1, тогда как на поздних стадиях десикации повышается экспрессия трегалазы, что обеспечивает быстрое использование запасённой трегалозы после регидратации. Анализ EST библиотек также выявляет аква- и глицеропорины, а также гемоглобины, что отражает перестройку водно-солевого баланса, транспорта газов и редокс гомеостаза.

Таким образом, сопоставление данных ангидробиотической культуры клеток Pv11 и личинок позволяет выделить общее «ядро» эффекторных блоков ангидробиоза, включающее антиоксидантную защиту, протеостаз, регуляцию метаболизма трегалозы, транспорт воды и сахаров, при дополнительном вкладе детоксикации ксенобиотиков и систем контроля качества РНК.

#### **4.2. Эффекторные модули ангидробиоза, «ядро» генов и процессы**

Преэкспозиция трегалозой при переходе от T0 к T48 сопровождается индукцией антиоксидантных и детоксификационных систем, включая тиоредоксины PvTrx1-1, PvTrx3, PvTrx7 и PvTrx10, а также ферменты ксенобиотической детоксикации, и активацией контуров контроля качества РНК. В фазе десикации D8 и D10d усиливаются протеостатические программы при одновременном подавлении трансляции. К ключевым компонентам ответа относятся LEA и HSP белки, а также PIMT метилтрансферазы, участвующие в постстрессовом восстановлении белков с изоаспартил повреждениями.

Согласованный ответ клеточной модели и личинок включает регуляцию метаболизма трегалозы и транспорта. У личинок индуцируются TPS и T6PP и переносчик Tret1, а на поздних стадиях десикации повышается экспрессия трегалазы, обеспечивая использование трегалозы после регидратации (Рисунок 24). Анализ EST библиотек также выявляет аква- и глицеропорины и гемоглобины, что отражает перестройку водно-солевого баланса, транспорта газов и редокс гомеостаза. В целом данные Pv11 и личинок выделяют общее «ядро» эффекторных блоков ангидробиоза, включающее антиоксидантную защиту, протеостаз, регуляцию трегалозного обмена и транспорт воды и сахаров, при дополнительном вкладе детоксикации и систем контроля качества РНК.

#### *Заключение по разделу 4 результатов*

Транскриптомный профиль клеточной линии Pv11 при ангидробиозе характеризуется максимальным расхождением экспрессии в «сухом» состоянии

по сравнению с контролем и последующей поэтапной нормализацией при регидратации. Уже на докритической стадии активируются метаболические и редокс-программы, отражающие подготовку к обезвоживанию.

Эффекторное «ядро» ответа, воспроизводимое в Pv11 и у личинок, включает антиоксидантные механизмы TRX, блоки протеостаза LEA, HSP и PIMT, ферменты трегалозного метаболизма и транспортёры воды и сахаров, при дополнительном участии детоксикационных систем и компонентов контроля качества РНК. В контурах поддержания геномной целостности отмечен сдвиг от доминирования путей устранения двуцепочечных разрывов в фазе десикации к устойчивой активности эксцизионной репарации нуклеотидов при выходе из ангидробиоза, при этом ранним маркёром восстановления является Rad16-подобный ген Pv.07646, индуцируемый в первые часы после регидратации.

Центральным элементом регуляторной архитектуры выступает NF- $\kappa$ B, который через сеть положительных контуров обратной связи активирует и поддерживает ключевые модули защитного ответа. Сравнение с *P. nubifer* подчёркивает специфичность этих программ для устойчивой к обезвоживанию линии *P. vanderplanki* как на уровне личинок, так и в клеточной модели Pv11.

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

### **5.1. Экспрессионная характеристика Hsf и семейств Hsp при дегидратации и регидратации**

Фазовый анализ экспрессии HSF и HSP у личинок *P. vanderplanki* выявил раннюю активацию регуляторного звена с последующей каскадной индукцией шаперонов, различающейся по временной специфике. Транскрипционный фактор Pv-hsf1 увеличивает экспрессию уже на ранних этапах входа в обезвоживание, что отражает запуск стресс-ответной программы, а динамика Pv-hsf1 и одного из ключевых шаперонов Pv-hsp90 сопоставлена между условиями теплового шока и ангидробиоза.

Сравнительно-геномный анализ указывает на элементы самоподдержания HSF-ответа. В условиях стресса показано усиление транскрипции Pv-hsf1, которое сопровождается обогащением HSF-специфичного мотива TCTAGAA в промоторных областях дегидратационно индуцируемых генов в пределах  $\pm 1000$  нт от сайта инициации транскрипции, что согласуется с моделью прямого участия Pv-HSF1 в регуляции дегидратационного ответа.

Экспрессия отдельных семейств HSP демонстрирует фазовую диверсификацию. Индуцируемая изоформа Pv-hsp70 формирует двухпиковый

профиль с первым подъёмом на D-8 и максимумом к D-48, а затем со вторым пиком на R-3 и снижением к R-24. Сходная двухволновая динамика характерна для Pv-hsp60, при этом Pv-hsp90 сохраняет повышенную экспрессию на этапе входа в ангидробиоз и в раннюю фазу восстановления, формируя вместе с HSC70 и индуцируемым HSP70 базовый шапероновый модуль ответа.

Малые шапероны дополняют этот контур фазово-специфическими включениями. Pv-hsp20 активируется рано, начиная с D-8, и остаётся повышенно экспрессированным не менее 24 часов после регидратации, тогда как Pv-p23 характеризуется поздней дегидратационно специфичной индукцией в интервале D-24–D-48, соответствующем переходу к предвитрификационной фазе. Временная организация позволяет выделить каскад Hsf, затем пик крупных шаперонов в поздней десикации, затем вторичные пики отдельных компонентов в ранней регидратации, с дополнительными ранним и поздним вкладками малого шаперона и p23-подобного белка (Рисунок 10).

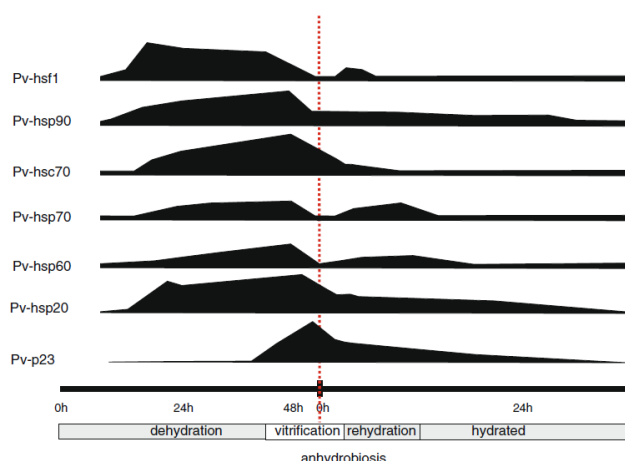


Рисунок 10. Временная схема стадий ангидробиоза, на которых у личинок хирономиды *Polypedilum vanderplanki* наблюдается повышение экспрессии генов, кодирующих белки теплового шока.

Регуляторная привязка подтверждается независимыми данными на клеточной модели Pv11. Трегалозная прекондиционирующая обработка ассоциирована с активацией Hsf и статистически значимым обогащением мотива TCTAGAA в промоторах индуцируемых генов, включая перекрывающийся набор генов, ко-активируемых у личинок и в Pv11.

Функциональная значимость показана с использованием siRNA против Hsf. Сайленсинг приводит к снижению экспрессии большинства предсказанных мишеней и к уменьшению выживаемости клеток Pv11 после десикации примерно на 80 процентов.

## 5.2. Регуляторная архитектура HSF и обогащение мотивов в промоторах

Показано, что ДНК-мотив TCTAGAA, соответствующий HSF-связанной регуляции, статистически обогащён в промоторных областях генов,



индуцируемых при десикации у *P. vanderplanki*, тогда как у десикационно-чувствительного *P. nubifer* сопоставимой ассоциации не выявлено. Для *P. vanderplanki* характерна концентрация этого мотива в пределах  $\pm 1000$  нт от TSS у десикационно-активируемых генов. Наиболее выраженное обогащение отмечено для функциональных групп LEA, тиоредоксинов и шаперонов, что согласуется с ролью HSF в координации ключевых эффекторных модулей ангидробиоза.

Несмотря на сопоставимый размер предполагаемого TCTAGAA-регулона в геномах обоих видов, его состав различается. Гены, содержащие TCTAGAA в промоторе у *P. vanderplanki* и лишённые его у *P. nubifer*, демонстрируют более выраженную индукцию при обезвоживании, зеркальный эффект для *P. nubifer* не отмечен. У *P. vanderplanki* также выявлены HSE-паттерны, серии из 2–4 мотивов с чередующейся ориентацией, что соответствует модели активной регуляции через тримеризацию HSF.

HSF-связанная регуляция затрагивает и метаболизм трегалозы. У *P. vanderplanki* часть генов трегалозного контура, включая TPS, содержит TCTAGAA в промоторах и демонстрирует выраженную индукцию при десикации, тогда как у *P. nubifer* аналогичная активация отсутствует. Признаки авторегуляции включают индукцию *Hsf* при десикации и наличие у *P. vanderplanki* двух сайтов TCTAGAA в промоторе *Hsf* с малым интерспейсером, при отсутствии аналогичного сайта у *P. nubifer*.

Функциональная значимость подтверждена в Pv11. Среди генов, ко-активируемых у личинок и в Pv11, доля промоторов с TCTAGAA повышена, а сайленсинг *Hsf* подавляет индукцию ряда мишеней и снижает выживаемость клеток после цикла десикация — регидратация (Рисунок 33). Дополнительно выявлены виды-специфичные события альтернативного сплайсинга *Hsf* при обезвоживании, потенциально влияющие на активность белка.

### **5.3. Функциональная роль HSF, данные на клеточной культуре Pv11**

Причинную роль HSF оценивали на клеточной линии Pv11, в которой трегалозная прекодиция индуцирует компоненты десикационного ответа. Сопоставление транскриптомных данных показало, что 14% генов, дифференциально экспрессируемых у личинок *P. vanderplanki* через 48 часов десикации, также изменяют экспрессию в Pv11 после 48-часовой инкубации с трегалозой, причём в 77% случаев направление изменений совпадает (тест Фишера,  $P < 10^{-10}$ ; OR = 10,5;  $\rho = 0,55$ ). Все эксперименты выполнены в трёх независимых биологических повторах.

Для таргетной валидации сформирован пул из 29 генов, включая *Hsf*, с обогащением по наличию промоторного мотива TCTAGAA. Были разработаны три siRNA против *Hsf*, две обеспечивали снижение экспрессии примерно на 80%, в последующих экспериментах использовали наиболее эффективную конструкцию HSF-200. На фоне нокдауна *Hsf* трегалозо-индуцируемая активация предсказанных мишеней HSF была статистически значимо ослаблена. Из 21 гена с верифицированной десикационно-индуцируемой активацией у 18 выявлены достоверные различия между HSF-200 и контролями после трегалозной обработки (t-тест с поправкой Бенджамини–Хохберга,  $P < 0,05$ ), в 16 случаях экспрессия снижалась (биномиальный тест,  $P < 0,002$ ), включая гены LEA и компоненты трегалозного метаболизма.

Функционально нокдаун *Hsf* приводил к резкому снижению выживаемости после цикла десикация — регидратация. Доля жизнеспособных клеток Pv11 была примерно в пять раз ниже по сравнению с контролем (критерий Манна–Уитни,  $P < 10^{-6}$ ), тогда как средняя скорость пролиферации в последующие дни статистически значимо не отличалась (ANOVA,  $P = 0,3$ ). В целом данные Pv11 подтверждают причинно-следственную роль *Hsf* в формировании десикационной устойчивости, поскольку его подавление снижает транскрипционную активацию ключевых защитных программ и уменьшает выживаемость клеток после обезвоживания.

#### *Заключение по разделу 5 результатов*

Совокупность результатов показывает, что ангидробиоз у *Polypedilum vanderplanki* реализуется как HSF-центричная регуляторная программа. Ранняя индукция *Hsf* запускает координированную активацию защитных путей, определяющих состояние клетки в ходе обезвоживания и при последующей регидратации. Во-первых, временная организация ответа указывает на директивную роль HSF. Индукция *Hsf* происходит на ранних этапах обезвоживания и предшествует фазовой активации шаперонных систем, включая *Hsp70* и *Hsp60*, которые демонстрируют двухволновую динамику с пиками на поздней десикации и в начале регидратации. Во-вторых, регуляторная архитектура подтверждает вовлечённость HSF в контроль ключевых эффекторных блоков. В промоторных областях генов, индуцируемых при десикации, выявлено обогащение HSF-связывающего мотива TCTAGAA, включая гены LEA, тиоредоксинов и компоненты трегалозного метаболизма. Дополнительно в промоторе *Hsf* у *P. vanderplanki* обнаружены дублированные сайты TCTAGAA с характерной позиционной конфигурацией, что указывает на

наличие контура авторегуляции, поддерживающего экспрессию *Hsf*. В-третьих, функциональная проверка в Pv11 подтверждает причинно-следственную связь. Нокдаун *Hsf* подавляет трегалозо-индуцируемую транскрипционную программу и приводит к пятикратному снижению выживаемости клеток после цикла высушивание — регидратация, что демонстрирует центральный вклад HSF в формирование десикационной устойчивости.

Сравнение с десикационно-чувствительным *P. nubifer* показывает, что критичным фактором является не само наличие «тепловых» генов, а промоторная переорганизация и усиление HSF-связанной регуляции. Таким образом, HSF функционирует как системообразующий регулятор, координирующий протеостатические, антиоксидантные и сахаро-метаболические модули, обеспечивая как переход в метаболически приостановленное состояние, так и безопасное восстановление активности при регидратации.

#### **6. Метаболический перезапуск при ангидробиозе и трегалозный резерв**

Проведено метаболомное профилирование на стадиях D0, D48 и R3 с сопоставлением с экспрессией ключевых ферментов, всего проанализировано 266 метаболитов. Показано, что устойчивость обеспечивается трегалозным резервом как источником энергии ранней регидратации, метаболическим «праймированием» в сухой фазе и неглутатионовыми контурами антиоксидантной защиты.

В углеводном обмене выявлен сдвиг в сторону трегалозы. На D48 возрастает трегалозо-6-фосфат при снижении гликолитических интермедиатов и индукции TPS, TPP и TRET1, а к концу десикации резко повышается экспрессия трегалазы, обеспечивая быстрый катаболизм трегалозы после регидратации. При регидратации углерод преимущественно направляется в пентозофосфатный путь для генерации NADPH, затем подключаются гликолиз и цикл трикарбоновых кислот. В сухом состоянии большинство интермедиатов цикла снижено при повышении цитрата и цис-аконитата, на R3 возрастает пируват и лактат и повышаются транскрипты АТФ-цитратлиазы, к R12 уровни интермедиатов приближаются к контролю.

Аденилатный пул при десикации смещается к низкоэнергетическим формам, однако аденилатный энергетический заряд сохраняется около 0,6. Существенная доля АТФ удерживается до поздних стадий высушивания, а дыхательная активность быстро восстанавливается в первый час регидратации (Рисунок 10).

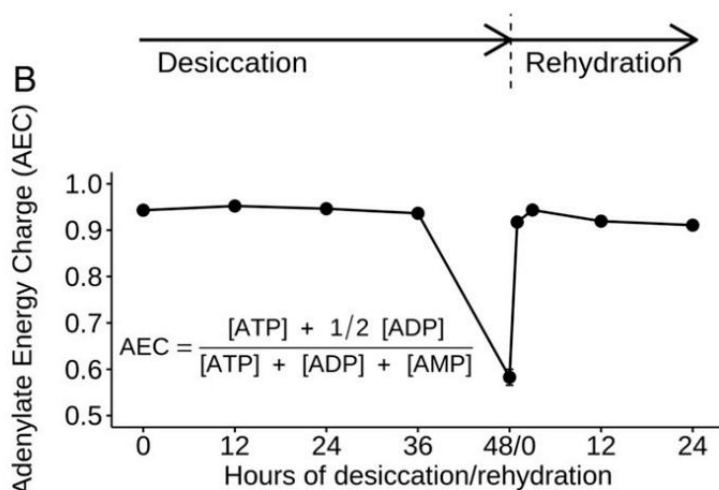


Рисунок 10. Аденилатный энергетический заряд (АЕС) в ходе десикации и последующей регидратации. Стандартное отклонение (SD) показано для образцов D0 и D48/R0, полученных в дубликатах.

В азотном обмене в сухом состоянии накапливаются мочевая кислота, аллантион и аллантоевая кислота, тогда как рост мочевины преимущественно приходится на период к R12, что согласуется с восстановлением экскреторной функции. Для чувствительного вида *P. nubifer* характерно раннее повышение мочевины уже в ходе десикации.

В антиоксидантной защите ранняя регидратация сопровождается повышением предшественников глутатиона и устойчивым ростом неглутатионовых метаболитов, включая офтальминую кислоту и  $\gamma$ -глу-2-аминобутират. В триптофановом, кинурениновом пути не выявлено накопления реакционно активного 3-гидроксикинуренина, при этом возрастает ксантуреновая кислота как более стабильный продукт его детоксикации. Идентифицированы два тандемных ортолога аминотрансферазы 3-гидроксикинуренина, локализованные в ARId 5 и транскрипционно индуцируемые десикацией при низком уровне экспрессии КАТ (Рисунок 11).

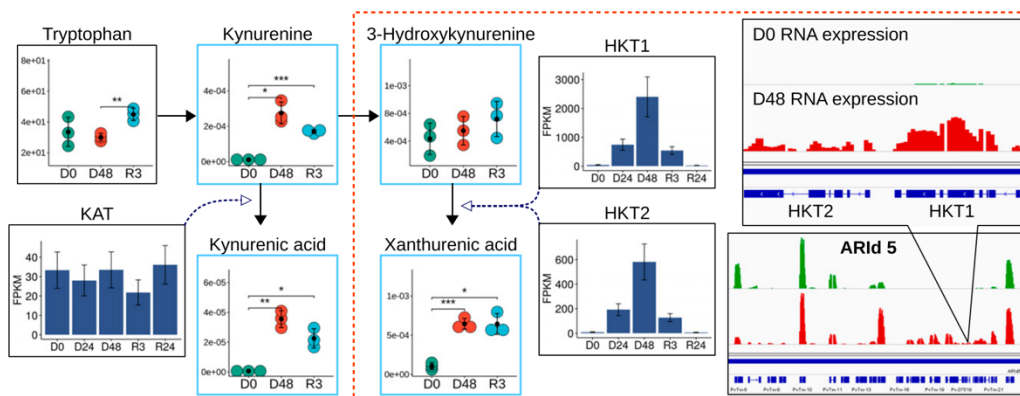


Рисунок 11. Кинурениновый путь (KYN) и профили экспрессии связанных ферментов. Блоки справа показывают локализацию предполагаемых генов HKT в острове генов, связанном с ангидробриозом, № 5 (ARId 5); зелёные и красные точки обозначают покрытие RNA-seq в моменты D0 и D48 соответственно. Звёздочки обозначают 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).

### Закключение по разделу 6 результатов

Полученные результаты уточняют молекулярную организацию ангидробриоза за счёт интеграции метаболомных и транскриптомных данных и позволяют реконструировать этапность регидратации. Показано, что трегалоза у *P. vanderplanki* выполняет двойную функцию, структурную в сухом состоянии и энергетическую как заранее сформированный резерв для быстрого запуска восстановительных процессов.

Этому соответствует усиление биосинтеза и транспорта трегалозы при десикации, предреактивационная индукция трегалазы и раннее перераспределение углерода в пентозофосфатный путь с последующим подключением гликолиза, цикла трикарбоновых кислот и ацетил-КоА-зависимых реакций, включая узел АТФ-цитратлиазы. Отмечено метаболическое «праймирование» митохондриального катаболизма в сухом состоянии, включая повышение цитрата и сохранение аденилатного энергетического заряда на уровне около 0,6 при поддержании пула АТР, что обеспечивает быстрый переход к аэробному метаболизму на ранних этапах регидратации.

Наряду с глутатионовой системой выявлена неглутатионовая антиоксидантная подсистема, включающая офальминовою кислоту и  $\gamma$ -глу-2-аминобутират, а также специализированную детоксикацию 3-гидроксикинуренина с формированием ксантуреновой кислоты при участии HKT. В совокупности двухконтурная поддержка редокс-баланса и безопасная утилизация азота минимизируют риск оксидативного и азотного стресса в

переходный период от «сухого» состояния к активному метаболизму и, вероятно, вносят вклад в межвидовые различия устойчивости, формируя перспективные мишени для последующей функциональной валидации.

## **7. Биотехнологический потенциал клеточной линии Pv11**

### **7.1. Доказательство принципа «сухого» хранения биоактивных белков в Pv11.**

Оценена сохранность ферментативной активности после индукции ангидробิโอ́за, полного высушивания, хранения в сухом состоянии при комнатной температуре и последующей регидратации на модели люциферазы *Luc*, активность которой регистрировали по биолюминесценции. Показано, что после цикла «высушивание — регидратация» активность *Luc* сохраняется на воспроизводимом уровне, при этом снижение суммарного сигнала связано главным образом с уменьшением доли выживших клеток, тогда как удельная активность на живую клетку остаётся близкой к исходной (Рисунок 12). Предварительная трегалозная индукция является обязательным условием сохранения ферментативной функции, без неё резко падают и выживаемость, и сигнал *Luc* после регидратации, тогда как преиндукция обеспечивает восстановление до уровней, сопоставимых с «мокрым» контролем (Рисунок 12).

Жизнеспособность оценивали тестом WST-8, активность измеряли в ранние сроки после регидратации, полная дегидратация достигалась примерно через 30 часов от начала процесса,  $n$  равнялось 3 (Рисунок 12). При длительном хранении в сухом состоянии активность фермента остаётся детектируемой вплоть до 372 суток, несмотря на снижение общей выживаемости популяции. Температурная нагрузка на высушенные клетки оказывает дозозависимый эффект, кратковременный нагрев до 60–80 °C снижает и жизнеспособность, и активность *Luc* по сравнению с комнатной температурой.

Фармакологический контроль показал, что сигнал после регидратации обусловлен сохранением уже синтезированных молекул фермента, а не быстрым ресинтезом *de novo*, поскольку активность остаётся измеримой при ингибировании трансляции циклохексимидом и эмитином.

Прикладная расширяемость подхода подтверждена на модели каталитически активной обратной транскриптазы AMV RT $\alpha$  при управляемой экспрессии, что демонстрирует потенциал Pv11 как системы для «сухого» хранения и последующего функционального восстановления бионагрузок ферментативного типа.

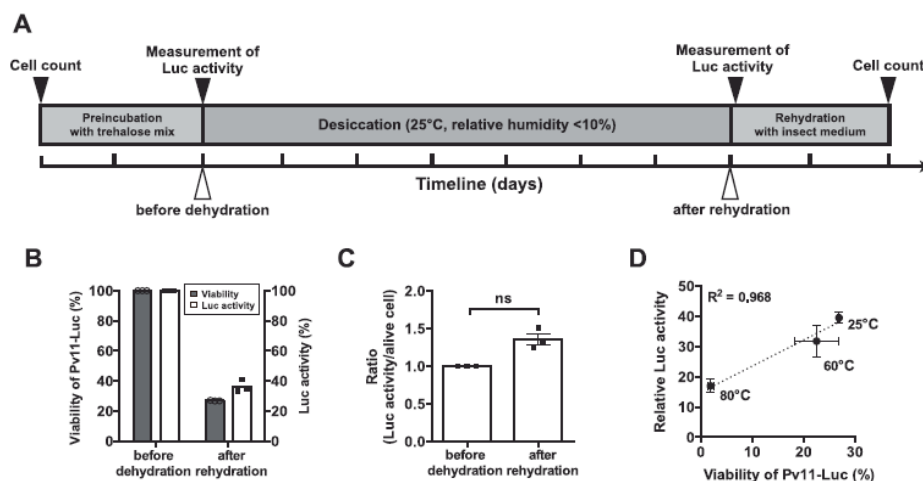


Рисунок 12. А) Схема эксперимента и временные точки обработок и измерений при высушивании и регидратации Pv11, полная дегидратация примерно через 30 ч. (В) Жизнеспособность Pv11-Luc и активность Luc после регидратации,  $n = 3$ , ошибки стандартная ошибка среднего. (С) Удельная активность Luc в выживших клетках, оценка по WST-8 и окрашиванию кальцеином, Манн—Уитни  $p = 0,064$ . (D) Влияние нагревания высушенных образцов 5 мин при 60 и 80 °C перед регидратацией, контроль 25 °C.

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

Идентифицирован и валидирован сильный эндогенный промотор 121 из области гена *Pv.00443*. Из клонированного фрагмента 1842 п. н. выделен вариант –1333 п. н., сохраняющий максимальную активность. Делеционный ряд показал градуированное снижение активности при укорочениях и сформировал линейку промоторов для настройки уровня транскрипции. В Pv11 промотор 121 активнее *PvGapdh*, *OpIE2*, *VmA3* и *Vmhsp90P2.9*.

Промотор 121 сохраняет высокую активность в ряде линий насекомых, что подтверждает его кросс-линейную применимость. На практике он обеспечивает эффективное получение стабильных трансформантов и отбор зеоцин-устойчивых клонов, а комбинации IE2–121 и 121–IE2 дают максимальную эффективность в тестируемых схемах. Дополнительно выделены минимальные варианты 266, 202

и 137 п. н. с остаточной активностью, перспективные для систем с низким фоном и индуцируемых конструкций.

### **7.3. Управляемая экспрессия генов в Pv11 в системе Tet-On на основе минимального промотора**

Для прикладных задач на платформе Pv11, помимо конститутивной экспрессии, разработана система управляемой индукции с низким фоном транскрипции. В качестве минимального транскрипционного ядра использовали укороченные производные эндогенного промотора 121. Показано, что вариант длиной 202 п. н. в составе кассеты Tet-On обеспечивает надёжную доксициклин-индуцируемую экспрессию как в стандартных условиях культивирования, так и при трегалозной преколонии, применяемой для индукции ангидробиоза.

Последовательностный анализ минимального промотора 202 п. н. выявил ключевые элементы транскрипционного ядра, включая TATA-box, Inr и DPE, а также bridge-элементы, при этом их организация отличается от типичных млекопитающих промоторов, что объясняет ограниченную применимость минимальных конструкций типа CMVmin в Pv1.

Экспериментально подтверждено, что добавление доксициклина приводит к накоплению репортёра AcGFP1 при минимальном уровне экспрессии в отсутствие индуктора, что согласуется с люциферазным анализом, выполненным в пяти независимых повторях.

Работоспособность системы в прикладном режиме продемонстрирована на  $\alpha$ -субъединице обратной транскриптазы AMV RT $\alpha$ . При доксициклин-индукции белок детектируется на иммуноблоте при низком фоне без индуктора как в стандартной среде, так и при обработке 600 мМ трегалозы. Функциональная активность подтверждена прямым измерением обратной транскриптазной активности в лизатах, при этом активность статистически значимо возрастает при +Dox и остаётся на уровне предела детекции при -Dox и в контролях (Рисунок 48В). Таким образом, Tet-On система на основе минимального промотора 202 п. н. обеспечивает сочетание низкого фонового уровня транскрипции и выраженного индуцируемого ответа, совместима с режимом трегалозной индукции ангидробиоза и применима как для репортёрных белков, так и для ферментативно активных продуктов.

### **7.4. Геномная модификация клеток Pv11 и стабильная интеграция экспрессионных конструкций**

Для биотехнологических задач Pv11 разработана схема адресной интеграции экспрессионных кассет без утраты ангидробиотического фенотипа. Кассета



AcGFP1–ZeoR была встроена в локус *Pv.00443* методом CRIS-PITCh, что подтверждено геномной ПЦР и секвенированием, а также отбором AcGFP1<sup>+</sup> клонов (Рисунок 49). Адресная вставка не снижала выживаемость после цикла «обезвоживание—регидратация» по сравнению с исходной Pv11, тогда как случайная интеграция сопровождалась её снижением, что демонстрирует преимущество таргетного подхода. Сформирован набор инструментов редактирования, включающий экспрессию Cas9 под промотором PvGapdh и Pol III-промотор PvU6 для gRNA, при этом делеционный вариант  $\Delta 1200$  сохраняет активность. Для повышения эффективности экспрессии gRNA разработан вариант PvU6b с тРНК-фланкированием. Для минимизации побочных эффектов валидированы «безопасные» сайты интеграции на хромосоме 1, Chr1:21143572, Chr1:21155382 и Chr1:21164645, вставка AcGFP1 и ZeoR в эти позиции не нарушала ангидробиоз и пролиферацию (Рисунок 52). Для Chr1:21164645 показано, что эффективность таргетной интеграции возрастает при длине гомологичных плеч не менее 250 п. н. Долговременная стабильность подтверждена для линии с интеграцией AcGFP1 в Chr1:21164645, после более года культивирования без селекции сохранялись флуоресценция, способность к ангидробиозу и темп роста.

#### *Заключение по разделу 7 результатов*

Показана технологическая реализуемость воспроизводимой генетической модификации Pv11 с сохранением ангидробиотического потенциала. Ключевым решением является адресная интеграция в геномно безопасные локусы, повышающая предсказуемость экспрессии и снижая риск фенотипических нарушений. Платформа применима для экспрессии и «сухого» хранения функциональных белков с восстановлением активности после регидратации, при необходимости дальнейшей стандартизации режимов предобработки и регидратации.

### **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 tandemным расположением шаперонов и антиоксидантов.
12. Обнаруженные генные дубликации указывают на множественные независимые источники инноваций и демонстрируют эволюционную стратегию расширения функционального репертуара через внутренние копирования.
13. Появившиеся в результате дубликаций 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 ангидробиозу.
18. Полученные подходы обеспечивают экспериментальную основу для изучения регуляторных механизмов устойчивости и позволяют стандартизировать работу с модельной системой *P. vanderplanki* на клеточном уровне.

#### СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. 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 and Chaperones. - 2024. - V. 29. - № 3. - P. 425-436. - DOI: 10.1016/j.cstres.2024.04.002. - WoS, SCOPUS, Q2, IF=3,8 (Глава 1).
2. 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 // Proc Natl Acad Sci U S A. - 2024. - V. 121. - № 14. - P. e2317254121. - DOI: 10.1073/pnas.2317254121. - WoS, SCOPUS, Q1, IF=11,2 (Глава 3).
3. 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. - V. 73. - P. 84-94. - DOI: 10.1016/j.mito.2023.11.002. - WoS, SCOPUS, Q2, IF=3,8 (Глава 1).
4. 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. Funano, T. Tang, Y. Hosokawa, **O. Gusev**, T. Okuda, T. Kikawada, Y. Yalikun // iScience. - 2022. - V. 25. - № 8. - P. 104639. - DOI: 10.1016/j.isci.2022.104639. - WoS, SCOPUS, Q1, IF=6,1 (Глава 1 / Глава 3).
5. 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 (Basel). - 2022. - V. 11. - № 4. - P. 487. - DOI: 10.3390/biology11040487. - WoS, SCOPUS, Q1, IF=5,1 (Глава 2 / Глава 3).

6. 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 Genom Bioinform.* - 2022. - V. 4. - № 2. - P. lqac029. - DOI: 10.1093/nargab/lqac029. - WoS, SCOPUS, Q1, IF=7,8 (Глава 1 / Глава 3).
7. 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 (Basel).* - 2022. - V. 13. - № 3. - P. 406. - DOI: 10.3390/genes13030406. - WoS, SCOPUS, Q1, IF=4,1 (Глава 2 / Глава 3).
8. Shaikhutdinov, N. Chironomid midges (Diptera) provide insights into genome evolution in extreme environments / N. Shaikhutdinov, **O. Gusev** // *Curr Opin Insect Sci.* - 2022. - V. 49. - P. 101-107. - DOI: 10.1016/j.cois.2021.12.009. - WoS, SCOPUS, Q1, IF=5,2 (Глава 1).
9. 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 // *Sci Rep.* - 2021. - V. 11. - № 1. - P. 19698. - DOI: 10.1038/s41598-021-98905-w. - WoS, SCOPUS, Q1, IF=5,9 (Глава 3).
10. 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. - DOI: 10.3390/biology10070607. - WoS, SCOPUS, Q1, IF=5,1 (Глава 3).
11. 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 // *Int J Mol Sci.* - 2021. - V. 22. - № 11. - P. 5798. - DOI: 10.3390/ijms22115798. - WoS, SCOPUS, Q1, IF=6,2 (Глава 3).
12. Ryabova, A. DetR DB: A Database of Ionizing Radiation Resistance Determinants / A. Ryabova, O. Kozlova, A. Kadirov, A. Ananeva, **O. Gusev**, E. Shagimardanova // *Genes (Basel).* - 2020. - V. 11. - № 12. - P. 1477. - DOI: 10.3390/genes11121477. - WoS, SCOPUS, Q1, IF=4,1 (Глава 1 / Глава 3).
13. 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 Brief.* - 2020. - V. 33. - P. 106527. - DOI: 10.1016/j.dib.2020.106527. - WoS, SCOPUS, Q1, IF=1,3 (Глава 1).
14. 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. - V. 11. - № 11. - P. 781. - DOI: 10.3390/insects11110781. - WoS, SCOPUS, Q1, IF=3,1 (Глава 3).
15. 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. - V. 11. - № 9. - P. 634. - DOI: 10.3390/insects11090634. - WoS, SCOPUS, Q1, IF=3,1 (Глава 3).

16. 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** // Proc Natl Acad Sci U S A. - 2020. - V. 117. - № 32. - P. 19209-19220. - DOI: 10.1073/pnas.2003650117. - WoS, SCOPUS, Q1, IF=12,7 (Глава 1 / Глава 3).
17. 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. Deviatiiarov, Y. Miyata, S. Tokumoto, R. Cornette, **O.A. Gusev**, T. Kikawada, E.I. Shagimardanova // Sci Rep. - 2020. - V. 10. - № 1. - P. 11633. - DOI: 10.1038/s41598-020-68330-6. - WoS, SCOPUS, Q1, IF=5,1 (Глава 2 / Глава 3).
18. 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. - V. 15. - № 3. - P. e0230218. - DOI: 10.1371/journal.pone.0230218. - WoS, SCOPUS, Q1, IF=3,7 (Глава 1 / Глава 3).
19. 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 // Sci Rep. - 2019. - V. 9. - № 1. - P. 7004. - DOI: 10.1038/s41598-019-43441-x. - WoS, SCOPUS, Q1, IF=5,1 (Глава 2 / Глава 3).
20. 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 // Sci Rep. - 2018. - V. 8. - № 1. - P. 17941. - DOI: 10.1038/s41598-018-36124-6. - WoS, SCOPUS, Q1, IF=5,1 (Глава 3).
21. 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. - DOI: 10.1007/978-981-13-1244-1\_14. - WoS, SCOPUS, Q1, IF=3,6 (Глава 2).
22. 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** // Proc Natl Acad Sci U S A. - 2018. - V. 115. - № 10. - P. E2477-E2486. - DOI: 10.1073/pnas.1719493115. - WoS, SCOPUS, Q1, IF=12,7 (Глава 1 / Глава 3).
23. Deviatiiarov, R. Application of a CAGE Method to an Avian Development Study / R. Deviatiiarov, M. Lizio, **O. Gusev** // Methods Mol Biol. - 2017. - V. 1650. - P. 101-109. - DOI: 10.1007/978-1-4939-7216-6\_6. - WoS, SCOPUS, Q1, IF=1,1 (Глава 2).
24. 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 // Sci Rep. - 2017. - V. 7. - № 1. - P. 6540. - DOI: 10.1038/s41598-017-06945-y. - WoS, SCOPUS, Q1, IF=5,1 (Глава 3).
25. 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. - V. 21. - № 1. - P. 109-120. - DOI: 10.1007/s00792-016-0888-9. - WoS, SCOPUS, Q1, IF=3,3 (Глава 3).
26. Cornette, R. A new anhydrobiotic midge from Malawi, *Polypedilum pembai* sp.n. (Diptera: Chironomidae), closely related to the desiccation-tolerant midge, *Polypedilum*

- vanderplanki* Hinton / R. Cornette, N. Yamamoto, M. Yamamoto, T. Kobayashi, N. Petrova, **O. Gusev**, S. Shimura, T. Kikawada, D. Pemba, T. Okuda // Systematic Entomology. - 2017. - V. 42. - № 4. - P. 814-825. - DOI: 10.1111/syen.12248. - WoS, SCOPUS, Q1, IF=4,8 (Глава 1 / Глава 3).
27. 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. - V. 21. - № 1. - P. 65-72. - DOI: 10.1007/s00792-016-0880-4. - WoS, SCOPUS, Q1, IF=3,3 (Глава 2/ Глава 3).
28. Deviatiiarov, R. The complete mitochondrial genome of an anhydrobiotic midge *Polypedilum vanderplanki* (Chironomidae, Diptera) / R. Deviatiiarov, T. Kikawada, **O. Gusev** // Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal. - 2017. - V. 28. - №2. - P. 218-220. - DOI: 10.3109/19401736.2015.1115849. - WoS, SCOPUS, Q1, IF=1,6 (Глава 3).
29. 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, S. Poddubko, **O. Gusev**, V. Sychev // International Journal of Astrobiology. - 2015. - V. 14. - № S1. - P. 137-142. - DOI: 10.1017/S1473550414000731. - WoS, SCOPUS, Q3, IF=2,1 (Глава 3).
30. 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. - V. 6. - №4. - P. 554-557. - DOI: 10.1007/s12668-016-0275-0. - WoS, SCOPUS, Q2, IF=3,44 (Глава 3).
31. 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. Zhironov, T. Okuda // Comparative Cytogenetics. - 2015. - V. 9. - №2. - P. 173-188. - DOI: 10.3897/CompCytogen.v9i2.9104. - WoS, SCOPUS, Q2, IF=1,1 (Глава 3).
32. 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. - V. 32. - №3. - P. 248-254. - DOI: 10.2108/zs140166. - WoS, SCOPUS, Q2, IF=0,9 (Глава 3).
33. 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. - V. 242. - №2. - P. 451-459. - DOI: 10.1007/s00425-015-2284-6. - WoS, SCOPUS, Q1, IF=4,5 (Глава 3).
34. **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. - V. 5. - Article 4784. - DOI: 10.1038/ncomms5784. - WoS, SCOPUS, Q1, IF=17,3 (Глава 3).
35. 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. Boudier, M. Tesarova, R. Deviatiiarov, A. Szilvs-Szab, E.E. Akkuratov, D. Pajuelo Reguera, H. Zeberg, M. Kaucka, M.E. Kastriti, J. Krivanek, T. Radaszkiewicz, K. Gmryov, 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, E.

- Erdélyi, Z. Máté, G. Szabó, T. Koehne, T. Harkany, K. Fried, J. Kaiser, P. Boor, C. Fekete, J. Rozman, J. Kasperek, P. Prochazka, R. Sedlacek, V. Bryja, **O. Gusev**, I. Adameyko // *Nature Communications*. - 2023. - V. 14. - №1. - Article 3092. - DOI: 10.1038/s41467-023-38663-7. - WoS, SCOPUS, Q1, IF=16,6 (Глава 3).
36. 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. - V. 16. - №1. - Article 24. - DOI: 10.1186/s40246-022-00399-8. - WoS, SCOPUS, Q1, IF=4,5 (Глава 2).
37. 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 // *Sci Rep*. - 2016. - V. 6. - P. 39545. - DOI: 10.1038/srep39545. - WoS, SCOPUS, Q1, IF=4,6 (Глава 1).
38. 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 Sci Space Res (Amst)*. - 2016. - V. 11. - P. 10-17. - DOI: 10.1016/j.lssr.2016.10.001. - WoS, SCOPUS, Q2, IF=2,73 (Глава 3).
39. 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. - V. 57. - № 2. - P. 98-104. - DOI: 10.3164/jcbn.15-20. - WoS, SCOPUS, Q2, IF=3,12 (Глава 3).
40. 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. - V. 56. - № 1. - P. 1-7. - DOI: 10.3164/jcbn.14-42. - WoS, SCOPUS, Q2, IF=3,12 (Глава 1).
41. 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. - V. 8. - S1. - P. 130. - WoS, SCOPUS, Q2, IF=2,79 (Глава 3).

### Список сокращений

AEC – аденилатный энергетический заряд  
 AMV RT $\alpha$  – каталитически активная обратная транскриптаза вируса птичьего миелобластома,  $\alpha$ -субъединица  
 ANOVA – дисперсионный анализ  
 ARId – остров генов, связанный с ангидробриозом, Anhydrobiosis-Related gene island  
 BUSCO – оценка полноты сборки генома по набору универсальных одно-копийных ортологов, Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs  
 CEGMA – оценка полноты сборки генома по набору консервативных эукариотических генов, Core Eukaryotic Genes Mapping Approach  
 dN/dS – отношение несинонимичных замен к синонимичным  
 EST – экспрессируемые последовательности, Expressed Sequence Tags  
 FDR – уровень ложного обнаружения, false discovery rate  
 GC – доля G и C нуклеотидов в ДНК  
 GO – онтология генов, Gene Ontology  
 GRAVY – средняя гидрофобность аминокислотной последовательности

НКТ – аминотрансфераза 3-гидроксикинуруенина  
HSC70 – конститутивный белок теплового шока 70 кДа  
HSF – фактор теплового шока, heat shock factor  
HSP – белки теплового шока, heat shock proteins  
IDP – внутренне неупорядоченные белки, intrinsically disordered proteins  
КАТ – кинуруенин-аминотрансфераза  
KEGG – база путей Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes  
KYN – кинуруениновый путь  
LEA – белки позднего эмбриогенеза, Late Embryogenesis Abundant  
LET – линейная передача энергии, linear energy transfer  
LIL – LEA-Island Located, гены, локализованные в LEA-острове  
Luc – люцифераза  
PIMT – L-изоаспартил-O-метилтрансфераза  
RIN – показатель интактности РНК, RNA integrity number  
RNeasy – набор для очистки РНК  
RPKM – нормализация экспрессии reads per kilobase per million mapped reads  
SAM – S-аденозилметионин  
siRNA – малые интерферирующие РНК  
SOLiD – платформа секвенирования Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection  
T6PP – трегалозо-6-фосфатфосфатаза  
Tret1 – переносчик трегалозы  
TPS – трегалозо-6-фосфатсинтаза  
TPM – нормализация экспрессии transcripts per million  
TRIzol – реагент для выделения РНК  
TRX – тиоредоксины  
WST-8 – тест жизнеспособности на основе водорастворимого тетразолия