

УДК 575.852, 574.24

СРАВНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ ОТВЕТА НА ТЕПЛОВОЙ И ХОЛОДОВОЙ СТРЕССЫ У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© 2024 г. Д. С. Неизвестный*, Е. Ю. Яковлева

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,
кафедра биологической эволюции

Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия

*E-mail: neizvestnyy.ds@do-student.ru

Поступила в редакцию 03.06.2023 г.

После доработки 10.10.2023 г.

Принята к публикации 16.11.2023 г.

Молекулярные механизмы ответа на стресс интересны с эволюционной точки зрения, так как часто оказываются под действием естественного отбора. В настоящем исследовании проведен обзор молекулярных механизмов реакции на температурные стрессы на примере модельного организма *Drosophila melanogaster*, у которого данные механизмы изучены довольно подробно. Проведено сопоставление реакции на тепловой и холодовой стрессы, и выделены сходные и специфические молекулярные механизмы ответа на них. Ключевыми процессами, общими для ответов на оба вида стресса, являются повышение экспрессии генов белков теплового шока (heat shock proteins, HSP) и генов семейства *Turandot*, а также активация серин-треониновой протеинкиназы p38 MAPK. При тепловом стрессе также наблюдается TORC2-опосредованное образование стрессовых гранул, а при холодовом — повышение синтеза кальций-связывающего белка DCA и криопротекторного белка FROST. Некоторое сходство реакций на тепловой и холодовой стрессы может быть объяснено сходным характером наблюдающихся повреждений и многофункциональностью белков, обеспечивающих стрессовые ответы. Вероятно, между толерантностью к тепловому и холодовому стрессам у *D. melanogaster* существует эволюционный компромисс: повышение устойчивости к одному стрессу приводит к снижению устойчивости к другому. Дрозофилы на разных стадиях жизненного цикла демонстрируют различную чувствительность к температурным воздействиям, и механизмы ответа на них также частично различаются. Сопоставление результатов исследований, посвященных эволюции белков, принимающих участие в ответе на температурные стрессы, позволяет заключить, что данные молекулярные механизмы быстро эволюционируют у насекомых, и выводы, полученные на *D. melanogaster*, стоит переносить на других животных, даже в пределах отряда двукрылых, с большой осторожностью. В заключение при помощи базы данных FlyBase была установлена локализация генов, продукты которых участвуют в ответе на температурные стрессы, в геноме дрозофилы. 15 из 21 обсуждаемых в работе генов расположены на третьей хромосоме, из них 10 — на ее правом плече, это позволяет выдвинуть гипотезу об адаптивном сближении генов, белки которых принимают участие в стрессовом ответе в геноме *D. melanogaster*. Возможно, это позволяет точнее синхронизировать регуляцию их экспрессии. Понимание молекулярных механизмов ответа насекомых на температурные стрессы может иметь практическое значение: помочь в предсказании изменений ареалов отдельных видов и их адаптации к быстро изменяющимся климатическим условиям, а также поспособствовать разработке инсектицидов, позволяющих противостоять насекомым-вредителям сельскохозяйственных культур и инвазивным видам.

DOI: 10.31857/S0044459624010024, EDN: wghuxz

Условия окружающей среды могут изменяться в течение геологических эпох, лет, сезонов года, суток и часов. Организмам необходимо адаптироваться к этим изменениям. В настоящей работе под экологическим стрессом будет пониматься любое значение параметра окружающей среды (температуры, pH, солености, влажности, освещенности,

дозы ионизирующего излучения и др.), которое оказывает негативное влияние на функционирование организма, проявляющееся в первую очередь в повышении смертности и снижении фертильности. Ответ (реакция) на стресс может выражаться в любом фенотипическом (биохимическом, физиологическом, поведенческом и др.) изменении,

которое возникает у организма в результате действия стресса на него или его предков. В настоящей работе проведен обзор молекулярных механизмов ответа на тепловой и холодовой стрессы у модельного организма *Drosophila melanogaster*.

Изучение механизмов ответа на температурные стрессы представляет большой интерес по ряду причин. Знание об устойчивости организма к высоким или низким температурам может помочь оценить способность организма адаптироваться к новым температурным режимам, предсказать изменения ареала, а также способность чужеродного для экосистемы вида стать инвазивным. Это особенно актуально в связи с глобальным изменением климата (Lehmann et al., 2020).

Кроме того, выявление общих закономерностей в молекулярно-физиологических реакциях на стресс у насекомых может помочь в разработке инсектицидов, позволяющих противостоять насекомым-вредителям сельскохозяйственных культур и инвазивным видам.

Наконец, изучение реакций на температурные стрессы у *D. melanogaster* представляет научный интерес для эволюционных биологов, так как гены ключевых белков ответа на стресс часто оказываются мишенью отбора в природе (Krebs, Feder, 1997; Anderson et al., 2003) и в лаборатории (McColl et al., 1996; Lerman, Feder, 2001), а механизмы ответа на температурные стрессы у *Drosophila* изменчивы в эволюционном масштабе времени.

МЕХАНИЗМЫ ОТВЕТА НА ТЕПЛОВОЙ СТРЕСС

Как правило, *D. melanogaster* в лабораторных условиях содержат при температуре 25 °C (Stocker, Gallant, 2008). В то же время не все параметры, коррелирующие с приспособленностью, достигают максимума при 25 °C. Так, например, суточная плодовитость (количество вылупившихся яиц за одни сутки) достигает максимума при 28 °C, общее количество отложенных за жизнь яиц — при 24 °C, а продолжительность фертильного периода самки — при 17 °C (David, Clavel, 1969). Тестирование реакции на тепловой стресс обычно проводят при температуре 37 °C (иногда выше), время воздействия в разных работах варьирует от 5 мин до нескольких часов. Показано, что повышение температуры до 37 °C на 2 ч или до 40 °C на 90 мин значительно снижает фертильность, плодовитость и выживаемость имаго *D. melanogaster* (Krebs, Loeschke, 1994; Bubli et al., 1998; Sørensen et al., 2005).

Исследование, в котором независимо тестировались на резистентность к высоким температурам три выборки имаго *D. melanogaster*, собранных в Юго-Восточной Австралии, показало, что уровень экспрессии гена *hsp70* (белок теплового шока HSP70) не имеет статистически значимого влияния на способность переносить тепловой шок (Jensen et al., 2010). Но ген *hsp70*, по-видимому, важен для обеспечения термоустойчивости личинок *D. melanogaster*: трансформация гена *hsp70* термофильной львинки *Stratiomys singleior*, у которой этот ген экспрессируется конститутивно (т.е. не зависимо от внешних условий), в геном *D. melanogaster* сделала личинку дрозофилы гораздо более устойчивой к тепловому стрессу, но не повлияла на устойчивость взрослых дрозофил (Shilova et al., 2018).

За резистентность к тепловому стрессу имаго дрозофилы отвечают белки теплового шока HSP68 и регуляторная некодирующая РНК *hsr-omega*. Аллельное состояние этих генов во многом определяет внутри- и межпопуляционную изменчивость *D. melanogaster* по способности переносить высокие температуры. При адаптации к тепловому стрессу в лабораторных условиях по этим генам идет отбор (McColl et al., 1996). В работе Макколлы и соавт. (McColl et al., 1996) всего 18 поколений отбора в лаборатории привели к существенному изменению частот аллелей *hsp68* и *hsr-omega* в экспериментальной популяции дрозофил.

Кавасаки с соавт. (Kawasaki et al., 2016) установили, что малый белок теплового шока HSP23 участвует в поддержании протеостаза в мышцах, нейронах и глии при тепловом стрессе.

Показано, что при тепловом стрессе у эмбрионов *D. melanogaster* на стадиях 10–17 (по классификации стадий эмбрионального развития дрозофилы (Campos-Ortega, Hartenstein, 1997)) сильнее всего (в 10 раз) повышается экспрессия генов малых белков теплового шока HSP22, HSP26, HSP27 и HSP23 (Leemans et al., 2000). Малые белки HSP, обеспечивающие рефолдинг белков, т.е. возвращение их нативной вторичной и третичной структур, имеют разную клеточную локализацию (HSP22 — в митохондриях, HSP23 и HSP26 — в цитозоле, HSP27 — в ядре), а также разные белки мишени (Morrow et al., 2006).

В лабораторных экспериментах по адаптации *D. melanogaster* к жизни при различных температурах у мух изменяется температура активации белка HSF — транскрипционного фактора, активирующего транскрипцию генов *hsp* (Lerman, Feder, 2001). Чем выше температура культивирования, тем выше температура активации белка HSF и активации экспрессии генов *hsp* соответственно.

Это можно объяснить, с одной стороны, адаптацией к высоким температурам других клеточных компонентов, в результате чего температура перестает быть стрессовой, с другой — вредностью экспрессии гена *hsp* в отсутствии стресса. Авторы статьи показали, что роль фенотипической пластичности и акклиматизации в изменении температуры активации белка HSF невелика, и ее изменение является именно результатом отбора (Lerman, Feder, 2001).

Белки семейства Turandot (Tot) транспортируются гемолимфой и обеспечивают гуморальную реакцию на разные виды стресса. В лабораторных экспериментах по адаптации дрозофил к высоким температурам в череде поколений наблюдается рост экспрессии генов *totA*, *totC*, *totM* и *totX* (половина семейства) (Hsu et al., 2021). По-видимому, белки Tot взаимодействуют с поврежденными белками так же, как и белки HSP, но не внутри клетки, а во внеклеточном пространстве (Ekengren et al., 2001).

Линии дрозофил, нокаутированные по одному из генов *tot* (в данном исследовании А, С, Х), демонстрировали пониженную устойчивость к сильному нагреванию, по сравнению с контролем (Amstrup et al., 2022). Повышение экспрессии генов *tot*, в отличие от генов *hsp*, возникает только в ответ на сильный стресс (причем чем выше температура, тем сильнее повышение экспрессии). Экспрессия запускается медленнее, чем в случае генов *hsp*, но длится существенно дольше (пик экспрессии генов *hsp* достигается через несколько часов, тогда как у генов *tot* — через 1.5 суток) (Amstrup et al., 2022). При этом пик устойчивости к повторному нагреванию у *D. melanogaster* наступает через 60 ч после теплового шока, когда экспрессии и *hsp*, и *tot* возвращаются к обычному уровню (Amstrup et al., 2022). Это позволяет предположить, что существуют и другие клеточные механизмы ответа на тепловой шок, с еще более пролонгированным действием, чем у белков Tot.

В ответ на высокую температуру, а также на осмотический стресс (повышенная концентрация NaCl), у *D. melanogaster* активируется D-МЕКК1-p38 MAPK путь (Inoue et al., 2001). p38 MAPK — это одна из митоген-активируемых серин-треониновых протеинкиназ, группа эволюционно консервативных у эукариот ферментов, участвующих в передаче сигнала на внеклеточные стимулы; D-МЕКК1 — это одна из протеинкиназ MAPK (МАРКК). Иноуэ и соавт. (Inoue et al., 2001) считают D-МЕКК1-p38 MAPK путь универсальным для всех экологических стрессов. Они работали с мухами, мутантными только по гену *D-МЕКК1*. Линию мух, лишенных гена

p38a, удалось получить другому коллективу (Craig et al., 2004). Дрозофилы, мутантные по гену *p38a* (у *D. melanogaster* два паралога гена *p38*: *p38a* и *p38b*, *p38b* у мутантов работал), как и мутанты по гену *D-МЕКК1*, имели нормальный иммунитет, но пониженную устойчивость к тепловому и окислительному стрессам, а также к голоданию. Причем чувствительность к тепловому стрессу была даже выше, чем у мутантов D-МЕКК1 (это объясняется тем, что D-МЕКК1 — не единственный белок, фосфорилирующий фермент p38 MAPK при стрессе). Неожданным результатом оказалось то, что мутанты по гену *p38a* имеют нормальную устойчивость к осмотическому стрессу. Возможно, ответ на осмотический стресс опосредуется с помощью белка p38 MAPKb.

Важным белковым комплексом, необходимым для обеспечения устойчивости к тепловому стрессу, является серин-треониновая протеинкиназа TORC2. TORC2 — это мультибелковый комплекс, состоящий из четырех субъединиц: Raptor, LST8, Sin1 и Rictor. Были получены две мутантные линии *D. melanogaster* с нефункциональными генами *Rictor* и *Sin1* (Jevtov et al., 2015). Мутантные по этим генам дрозофилы становятся чувствительны к высоким температурам, но не к другим видам стресса. Предполагается, что протеинкиназа TORC2 через фосфорилирование протеинкиназы Akt1 играет ключевую роль в образовании стрессовых гранул¹. У мух, мутантных по гену *Rictor* и, соответственно, лишенных функционального белкового комплекса TORC2, образование стрессовых гранул в большинстве тканей существенно замедляется. Также в стрессовых гранулах накапливаются проапоптотические киназы, поэтому образование стрессовых гранул подавляет апоптоз (Arimoto et al., 2008).

Таким образом, можно выделить три клеточных реакции, которые активируются в ответ на тепловой стресс: рефолдинг (возвращение функциональной конформации) денатурировавшихся белков белками HSP и Turandot; активация D-МЕКК1-p38 MAPK пути, приводящая к изменению экспрессии генов; образование стрессовых гранул, вызванное белковым комплексом TORC2.

¹ Также цитоплазматические рибонуклеопротеиновые частицы (cytoplasmic ribonucleoprotein particles) — это плотные безмембранные скопления комплексов незаконченной трансляции (белки и РНК), которые образуются в условиях, когда клетка не может правильно закончить трансляцию (Jevtov et al., 2015).

МЕХАНИЗМЫ ОТВЕТА НА ХОЛОДОВОЙ СТРЕСС

Холодовой стресс принято разделять на косвенное холодное воздействие (*indirect chilling injury*) (длительное воздействие умеренно низких температур; обычно 15 °C) и холодовой шок (кратковременное, но сильное понижение температуры; от 0 до –15 °C на время до 6 ч) (Sinclair, Roberts, 2005). Полулетальная температура (температура, при которой за 24 ч погибает половина особей) у *D. melanogaster* составляет 3 °C (Goto, 2000). На клопах *Pyrrhocoris apterus* показано, что холодовой шок у насекомых приводит к изменению структуры мембран и нарушению ионного гомеостаза (Košťál et al., 2004). При холодовом шоке насекомое теряет способность поддерживать мышечный потенциал покоя и впадает в ознобовую кому² (Hosler et al., 2000).

У многих экзотермных организмов адаптация к низким температурам сопровождается повышением доли ненасыщенных жирных кислот в клеточной мембране, так как это понижает температуру перехода мембраны из жидкокристаллического в агрегатное состояние геля (переход из жидкокристаллического в гелевое агрегатное состояние сопровождается прекращением латеральной диффузии липидов и образованием перфораций, через которые вытекают ионы, нарушая электрохимический градиент) (Hazel, 1990). Удалось показать, что культивирование *D. melanogaster* при пониженных температурах незначительно изменяет химический состав клеточных мембран (Overgaard et al., 2008). В частности, у мух, выращиваемых при 15 °C, увеличивается доля линолевой кислоты (18 : 2) и уменьшается доля пальмитолеиновой кислоты (16 : 1). Тем не менее общее соотношение насыщенных и ненасыщенных кислот в клеточной мембране дрозофилы остается постоянным.

Несмотря на то, что активность белков HSF и, соответственно, экспрессия генов *hsp* повышаются после охлаждения, мутанты с нефункциональным белком HSF имеют нормальную устойчивость к холоду (Nielsen et al., 2005). Возможно, другие механизмы ответа на холодовой стресс могут компенсировать отсутствие экспрессии гена *hsp*.

Ген *Dca* (*Drosophila* cold acclimation) повышает свою экспрессию при косвенном холодовом воздействии на дрозофил (Goto, 2000). Точная

функция белка DCA остается неясной, но, по-видимому, она связана с регуляцией внутриклеточных концентраций кальция. Белок DCA, играющий ключевую роль в долговременной адаптации к умеренно низким температурам, в ответе на холодовой шок (т.е. на сильное кратковременное понижение температуры) участия не принимает (Sinclair et al., 2007).

Ген Frost (*Fst*, белок — FST), как и ген *Dca*, открыт и впервые охарактеризован Шином Гото (Shin G. Goto) (Goto, 2001). Гото зафиксировал увеличение экспрессии этого гена в ответ на холодовой шок и, исходя из аминокислотной последовательности, предположил, что его продукт является белком, секретируемым во внеклеточное пространство. Позже было показано, что экспрессия гена *Fst* у имаго *D. melanogaster* не изменяется непосредственно в течение холодового шока, а значительно возрастает во время фазы восстановления при 25 °C, достигая максимального, 42-кратного, увеличения, по сравнению с контролем через 2 ч (Colinet et al., 2010). В этом же исследовании 2010 г. было показано, что у дрозофилы с подавленным РНК-интерференцией геном *Fst* скорость выхода из ознобовой комы снижается, а смертность при холодовом шоке увеличивается. Точная функция белка FST остается неясной, но его аминокислотная последовательность дает возможность предположить, что это муциноподобный белок (так называют неоднородную группу сильно гликозилированных белков, ключевым свойством которых является способность образовывать гели). Возможно, белок FST участвует в поддержании целостности клеточных мембран (Colinet et al., 2010). Другой коллектив авторов (Bing et al., 2012) считает, что трехмерная структура белка FST не похожа на муцин, и предполагает, что он может выполнять роль сигнального белка, опосредующего апоптоз. Неожиданный результат дало изучение линии дрозофил с нокаутированным геном *Fst* (*Fst*-null), полученной с помощью CRISPR-опосредованной гомологичной рекомбинации (Newman et al., 2017). Как ни странно, *Fst*-null мухи не имели отличий от контрольных мух по скорости восстановления после холодового шока или смертности в результате него. Но авторы установили, что *Fst*-null самки дрозофил имеют сильно пониженную фертильность после холодового шока. В этой же работе показано, что основной рост экспрессии гена *Fst* наблюдается в мальпигиевых сосудах и кишечнике, где выше и базовый уровень экспрессии этого гена. Авторы статьи считают, что белковый продукт гена *Fst* необходим для защиты яйчников от постхолодового повреждения, но для доказательства

² Ознобовая кома (*chill-coma*) — это состояние, при котором мышцы насекомого теряют способность проводить потенциалы действия (Goller, Esch, 1990). Температура впадения в ознобовую кому видоспецифична и у *D. melanogaster* составляет около 7 °C (Hosler et al., 2000).

этого предположения требуется показать, что белок FST транспортируется к яичникам от мест своего синтеза. В пользу этой гипотезы говорят ранее полученные результаты исследования полиморфизма гена *Fst* у диких австралийских популяций *D. melanogaster*: в популяциях, живущих на разных широтах, преобладают разные аллели гена *Fst*, но мухи с разным аллельным состоянием этого гена демонстрировали одинаковые результаты в тестах на холодовой шок (Hoffmann et al., 2012).

Гены семейства Turandot, играющие ключевую роль в ответе на тепловой шок, повышают свою экспрессию и при холодовом шоке (Salehipourshirazi et al., 2017).

Протеинкиназа p38 MAPK активируется при холодовом шоке у табачной белокрылки *Bemisia tabaci* (Li et al., 2012) и мясной мухи *Sarcophaga crassipalpis* (Fujiwara, Denlinger, 2007), однако в случае холодового стресса киназа, активирующая фермент p38 MAPK, неизвестна, а мишени p38 MAPK изучены очень плохо. Одной из мишеней протеинкиназы p38 MAPK при реакции на холодовой стресс является гликогенфосфорилаза — ключевой фермент синтеза глицерина (Fujiwara, Denlinger, 2007). Глицерин обладает криопротекторным действием и повышает концентрацию в ответ на холод как у *Sarcophaga crassipalpis* (Yoder et al., 2006), так и у *D. melanogaster* (Xu et al., 2018).

Итак, при холодовом стрессе, как и при тепловом, повышают свою экспрессию гены *hsp* и Turandot, активируется протеинкиназа p38 MAPK, уникальным для холодового стресса процессом является повышение экспрессии генов криопротекторного белка FROST и кальций-связывающего белка DCA.

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ТОЛЕРАНТНОСТЬ ИЛИ КОМПРОМИСС?

Теоретически между молекулярными механизмами реакции на разные виды экологического стресса может существовать как перекрестная толерантность (если адаптация к одному виду стресса повышает устойчивость к другому), обусловленная сходными механизмами повреждений, например денатурацией белков, так и эволюционный компромисс (trade-off) (если адаптация к одному виду стресса приводит к снижению устойчивости к другим).

В нескольких исследованиях была показана перекрестная толерантность между холодовым шоком и дегидратацией у коллемболы *Folsomia candida* (Bayley et al., 2001) и таракана *Celatoblatta quinque maculata* (Sinclair, 2000).

Между тепловым и холодовым стрессами у *D. melanogaster* перекрестной толерантности выявлено не было (MacMillan et al., 2009), но наборы генов, повышающие свою экспрессию при этих двух видах стресса, значительно перекрываются (Sørensen et al., 2007) (табл. 1). То есть адаптация к холодовому и тепловому стрессам, по-видимому, может затрагивать одни и те же клеточные системы и гены, но по-разному изменять их работу. С этим предположением хорошо согласуются данные о влиянии аллельного состояния гена *hsr-omega* на устойчивость к тепловому и холодовому стрессам у австралийских популяций *D. melanogaster*: L-аллели связаны с повышенной устойчивостью к низким температурам и пониженной — к высоким температурам, S-аллели — наоборот (Anderson et al., 2003). Но в любом аллельном состоянии экспрессия гена *hsr-omega* повышается при обоих видах стресса.

Как объяснить то, что при холодовом стрессе повышается экспрессия гена *hsp*? Низкие температуры способны приводить к денатурации белков как напрямую (хоть и в меньшей степени, чем высокие), так и за счет изменения pH вследствие нарушения целостности клеточных мембран (Košťál et al., 2004; Bischof, 2005). Накопление денатурированных белков в клетке, в свою очередь, приводит к переходу белков HSF в активную форму и повышению экспрессии генов *hsp* (Shamovsky, Nudler, 2008). Малые белки теплового шока, помимо рефолдинга белков, могут обеспечивать повышение текучести клеточной мембраны в условиях пониженных температур (Tsvetkova et al., 2002).

Таким образом, некоторое сходство реакций на тепловой и холодовой стресс может быть связано, с одной стороны, с перекрывающимся характером повреждений, наблюдающихся при этих видах стресса, с другой — с многофункциональностью белков, обеспечивающих защиту от стрессовых воздействий. Обобщающая схема механизмов ответа на температурные стрессы представлена на рис. 1.

РАСПОЛОЖЕНИЕ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ТЕПЛОМЫ И ХОЛОДОВЫМ СТРЕССАМИ, В ГЕНОМЕ *D. MELANOGASTER*

С помощью базы данных FlyBase (Jenkins et al., 2022) мы установили локализацию обсуждаемых в работе генов в геноме *D. melanogaster*.

Как видно из табл. 2, правое плечо третьей хромосомы сильно обогащено генами, участвующими в реакциях на тепловой и холодовой стрессы. Интересно, что ген регукальцина, от которого путем

Таблица 1. Сравнение молекулярных механизмов реакции *D. melanogaster* на тепловой и холодовой стрессы

Молекулярный механизм	Тепловой стресс	Холодовой стресс
Изменение состава клеточных мембран	Не зафиксировано	Линолевой жирной кислоты (18 : 2) становится больше, пальмитолеиновой кислоты (16 : 1) — меньше; средняя насыщенность жирных кислот не изменяется
Активация белков HSF и повышение экспрессия генов <i>hsp</i> (<i>hsp70</i> , <i>hsp68</i> , <i>hsp-omega</i> , <i>hsp22</i> , <i>hsp26</i> , <i>hsp27</i> и <i>hsp23</i>)	Активация белков HSF, мутантные по гену <i>Hsf</i> линии имеют пониженную выживаемость. Гены <i>hsp</i> экспрессируются, и их белковые продукты обеспечивают рефолдинг белков. Наблюдается отбор аллелей гена <i>hsp-omega</i> , понижающих устойчивость к холодовому стрессу	Активация белков HSF, мутантные по <i>Hsf</i> линии имеют обычную выживаемость. Гены <i>hsp</i> экспрессируются, и их белковые продукты обеспечивают рефолдинг белков, малые белки HSP также участвуют в поддержании текучести мембраны. Наблюдается отбор аллелей <i>hsp-omega</i> , понижающих устойчивость к тепловому стрессу
Гены семейства Turandot	Экспрессия повышается, мутанты имеют пониженную жизнеспособность	Экспрессия повышается, жизнеспособность мутантов не исследована
Активация протеинкиназы p38 MAPK(a)	Фосфорилируется протеинкиназой D-MEKK1, повышенная чувствительность мутантов	У дрозофилы не изучена, ортолог активируется у <i>Bemisia tabaci</i> и <i>Sarcophaga crassipalpis</i> , фосфорилирующая киназа не известна
TORC2-опосредованное образование стрессовых гранул	Наблюдается; у мутантов по генам субъединиц белка TORC2 образование стрессовых гранул нарушается, мутанты имеют пониженную устойчивость	Не наблюдается
Рост экспрессии генов <i>Dca</i> и <i>Fst</i>	Не наблюдается	Наблюдается (для гена <i>Dca</i> только при косвенном холодовом воздействии)

Таблица 2. Локализация генов, ассоциированных с реакцией на тепловой и холодовой стрессы

Область генома (цифра — номер хромосомы, R/L — правое / левое плечо)	Гены, находящиеся в данной области
3 R	<i>hsp70</i> , <i>hsp68</i> , <i>hsp-omega</i> , <i>Fst</i> , <i>Dca</i> , <i>totA</i> , <i>totC</i> , <i>totX</i> , <i>p38a</i> , <i>D-MEKK1</i>
3 L	<i>hsp22</i> , <i>hsp26</i> , <i>hsp27</i> , <i>hsp23</i> , <i>hsp83</i>
2 R	<i>Hsf</i> , <i>totM</i> , <i>Sin1</i>
2 L	<i>Raptor</i>
X	<i>Lst8</i> , <i>Rictor</i>

Источник: составлена авторами с использованием базы данных FlyBase (Jenkins et al., 2022), а также (Arboleda-Bustos, Segarra, 2011).

тандемной дупликации произошел *Dca*, находится на X-хромосоме. По-видимому, *Dca* оказался на правом плече третьей хромосомы только после неофункционализации (Arboleda-Bustos, Segarra, 2011).

У пространственной близости генов, белки которых обеспечивают ответ на экологические

стрессы, может быть несколько непротиворечащих друг другу объяснений.

Первое состоит в том, что рассматриваемые гены являются паралогами, возникшими в результате тандемных дупликаций, и мутации не успели привести к их пространственному разделению.

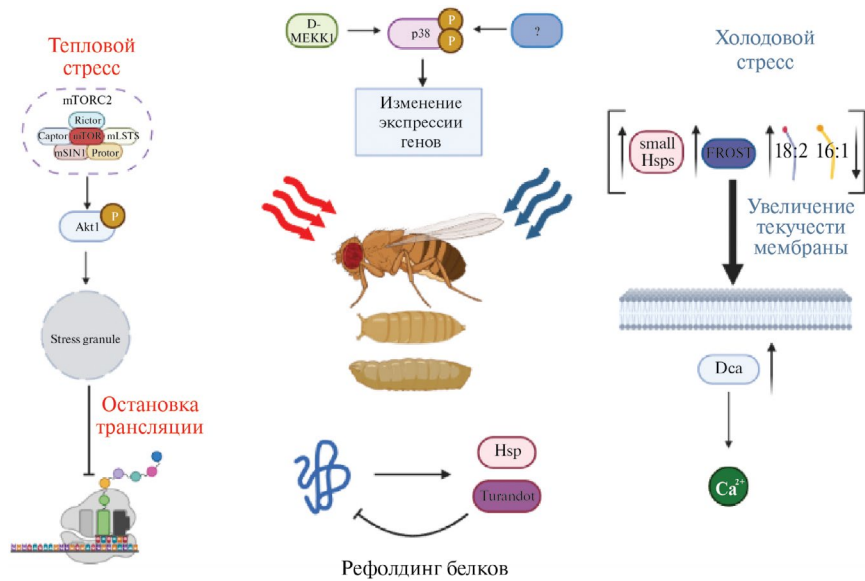


Рис. 1. Обобщающая схема механизмов ответа на температурные стрессы у *D. melanogaster*.

Это предположение может быть справедливо для генов малых белков теплового шока, которые находятся на левом плече третьей хромосомы, и все являются паралогами (Jenkins et al., 2022), но явно не может объяснить скопление неродственных генов на правом плече третьей хромосомы.

Второе может быть таким: естественный отбор поддерживает организмы, у которых гены, сходным образом регулирующие и активирующиеся в ответ на один и тот же стимул, сближены в геноме, так как это делает регуляцию экспрессии более точной (Hurst et al., 2004). Пространственное сближение экспрессирующихся в данных условиях (в ответ на данный стимул) генов должно приводить к уменьшению количества соседних по отношению к ним генов (рис. 2). При экспрессии гена хроматин в его окрестности деконденсируется, что повышает вероятность ошибочной активации соседних генов (Hurst et al., 2004). Соответственно, сближение функционально связанных генов должно приводить к уменьшению количества генов, которые могут быть ошибочно активированы/репрессированы в ответ на данный стимул (Gaunt, 2015). Также пространственное сближение дает возможность функционально связанным генам управляться общим энхансером (сайтом связывания транскрипционного фактора), что позволяет точнее синхронизировать транскрипцию (Gaunt, 2022). Например, у *D. melanogaster* наличие общих энхансеров было показано для HOX-генов комплексов Bithorax (Celniker et al., 1990) и Antennapedia (Ohtsuki et al., 1998), генов паралогов nubbin и pdm2 (Loker, Mann,

2022) и генов комплекса bric-a-brac (bab) (Bourbon et al., 2022).

СОПОСТАВЛЕНИЕ РЕАКЦИИ НА ТЕМПЕРАТУРНЫЕ СТРЕССЫ У РАЗНЫХ ЖИЗНЕННЫХ СТАДИЙ *D. MELANOGASTER*

Разные стадии жизненного цикла *D. melanogaster* демонстрируют различную устойчивость к тепловому стрессу. Показано, что имаго дрозофилы имеют более высокую выживаемость при высоких температурах (37, 38, 39, 40 и 41 °C в течение часа), чем куколки и личинки (Moghadam et al., 2019). При этом тепловое закалывание, т.е. воздействие высоких, но не приводящих к повышению смертности температур (в данном случае 35 °C в течение часа), приводило к сильному снижению смертности преимагинальных стадий при последующем воздействии более высоких температур, не повышало выживаемость однодневных имаго, а выживаемость трехдневных имаго даже снижало (Moghadam et al., 2019).

Большую устойчивость имаго к тепловому стрессу, по сравнению с куколкой, можно объяснить тем, что экстремальные температуры (как низкие, так и высокие) сильно увеличивают энергетические затраты мухи на метаморфоз (Merkey et al., 2011). Причины большей устойчивости имаго, по сравнению с личинкой, остаются неясными.

Меньшую способность имаго к закалыванию можно объяснить эффектом Богерта — адаптивная пластичность поведения ослабляет отбор на

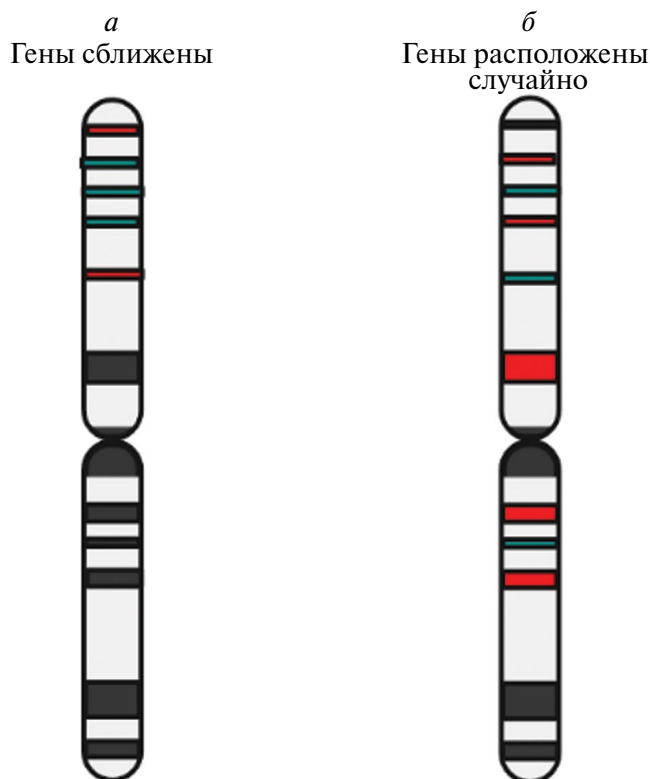


Рис. 2. Сравнение количества соседних генов при (а) сближении совместно экспрессирующихся генов и (б) их случайном расположении. Видно, что в случае варианта а совместно экспрессирующиеся гены (показаны зеленым цветом) имеют меньше соседних генов (показаны красным цветом), что должно снижать вероятность ошибочной активации/репрессии нецелевых генов.

поддержание адаптивной пластичности других фенотипических признаков, в частности физиологических (Bogert, 1949). Можно предположить, что летающее мобильное имаго может избегать теплового стресса путем перелета в более холодный участок, тогда как преимагинальные стадии менее мобильны и непрерывно находятся в своем субстрате (гниющих плодах). Более того, самки *D. melanogaster* не способны оценить температурную пригодность плода для развития яиц и поэтому могут обречь свое потомство на тепловой стресс (Feder et al., 1997).

Дженсен с соавт. (Jensen et al., 2007) исследовали различия выживаемости и способности к закаливанию *D. melanogaster* на разных жизненных стадиях при холодном стрессе (в данном исследовании воздействовали отрицательными температурами, приводящими к смертности половины мух на данной жизненной стадии). Как и в работе Могадама и соавт. (Moghadam et al., 2019), имаго имели большую выживаемость, чем личинки и куколки, в то же время снижение смертности при холодном

шоке после закаливания наблюдалось у имаго, но не наблюдалось у преимагинальных стадий. Авторы исследования объяснили отсутствие закаливания у личинок и куколок тем, что холодное закаливание (снижение температуры с 25 до 0 °C со скоростью 0.25 °C в минуту с последующим поддержанием 0 °C в течение часа) было слишком экстремальным и само снижало выживаемость на этих стадиях. Можно предположить, что отбор поддержал развитие закаливания у имаго при холодном стрессе потому, что в природе мухе сложнее противостоять низкой температуре окружающей среды путем миграции, тогда как при тепловом шоке можно перелететь с прогреваемого участка в тень.

Отдельного внимания заслуживает рассмотрение различий в активации конкретных молекулярных механизмов ответа на стресс в зависимости от жизненной стадии.

Вероятно, некоторые механизмы ответа на стресс универсальны для всех жизненных стадий дрозофилы. Так, в исследовании Джевтова и соавторов (Jevtov et al., 2015) мутантные по генам *Rictor* и *Sin1* (т.е. с нефункциональной серин-треониновой протеинкиназой TORC2) линии дрозофил имели пониженную устойчивость к тепловому шоку на всех стадиях жизненного цикла. Линии дрозофил с нефункциональным белком HSF имеют сниженную выживаемость при тепловом шоке на любых стадиях жизненного цикла, хотя особенно сильно выживаемость снижается в ранних личиночных возрастах (Jedlicka et al., 1997).

Было показано, что белок HSP70 не важен для обеспечения термоустойчивости имаго *D. melanogaster* (Jensen et al., 2010), но играет важную роль в ответе на стресс у личинки (Shilova et al., 2018).

Степень холодовой индукции транскрипции гена *Fst* неочевидно зависит от возраста дрозофилы: личинки первого и второго возрастов (L1 и L2), а также стареющие имаго не увеличивают экспрессию гена *Fst* при холодном шоке, при этом личинки L2 имеют высокую конститутивную экспрессию данного гена. В то же время различия в степени холодовой индукции и базовой экспрессии гена *Fst*, по-видимому, не влияют на устойчивость к холодному шоку у разных стадий жизненного цикла дрозофилы (Bing et al., 2012).

Метаморфоз у насекомых сопровождается радикальной перестройкой всех систем органов (Consoulas et al., 2000), поэтому существование у дрозофилы различий в механизмах ответа на экологические стрессы не является неожиданным. Понимание различий ответа на стресс на разных жизненных стадиях необходимо для точной оценки способности насекомого адаптироваться

к неблагоприятным факторам окружающей среды, особенно если принять во внимание, что преимагинальные стадии демонстрируют меньшую устойчивость к тепловому и холодовому стрессу (Jensen et al., 2007; Moghadam et al., 2019). Тем не менее большая часть исследований влияния теплового и холодового стресса на *D. melanogaster* проводится на имаго, специфика ответа на эти стрессы у преимагинальных стадий остается малоизученной и требует дальнейших исследований.

ЭВОЛЮЦИОННАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ОТВЕТА НА ТЕМПЕРАТУРНЫЕ СТРЕССЫ

В заключение рассмотрим эволюционную историю механизмов ответа на температурные стрессы у *D. melanogaster*.

HSP70 — это древний белок, который обнаруживается у всех клеточных форм жизни (Gupta, Golding, 1993). Нуклеотидная последовательность гена *hsp70* человека на 73% идентична последовательности *D. melanogaster* и на 50% — последовательности *Escherichia coli* (Hunt, Morimoto, 1985).

Вероятно, у общего предка отряда Diptera было два паралога гена *hsp70* (Benedict et al., 1993). У общего предка рода *Drosophila* копий гена *hsp70* также было две. Примерно 10–15 млн лет назад внутри подрода *Sophophora*, объединяющего группы видов *D. melanogaster*, *D. ficusphila*, *D. elegans*, *D. takahashii*, *D. suzukii*, *D. eugracilis*, произошла дополнительная дупликация, которая, по-видимому, была адаптивной: она позволила увеличить индуцибельную (т.е. возникающую только в ответ на стимул) экспрессию гена *hsp70*, что повысило устойчивость личинок к тепловому стрессу. В настоящее время клада дрозофил с дополнительно удвоенными генами *hsp70* включает больше 40 видов. У вида *D. melanogaster* путем тандемной дупликации одного из четырех паралогов общее число копий гена *hsp70* достигло пяти (Bettencourt, Feder, 2001).

Уровень экспрессии гена *hsp70* не влияет на устойчивость имаго к стрессу у *D. melanogaster*, в то время как известно, что у других животных, а именно млекопитающих (Parida et al., 2020), губок (Itskovich et al., 2018) и других насекомых (Su et al., 2018), экспрессия *hsp70* повышается при воздействии высоких температур на взрослое животное, а высокая конститутивная экспрессия *hsp70* обеспечивает высокую термотолерантность у львинок (сем. Stratiomyidae) (Garbuz et al., 2011). Вопрос о том, когда белок HSP70 у имаго дрозофилы утратил роль в реакции на тепловой стресс, остается открытым.

Неожиданным является факт, что *D. melanogaster* с нефункциональной протеинкиназой TORC2 имеет только повышенную чувствительность к нагреванию, но нормальную жизнеспособность и устойчивость к другим видам стресса (Jevtov et al., 2015). У дрожжей мутанты с дефектным ферментом TORC2 имеют пониженную устойчивость не только к тепловому, но и к холодовому, осмотическому и окислительному (Weisman, Choder, 2001) стрессам, а также к азотному голоданию (Ikeda et al., 2008). У млекопитающих протеинкиназа TORC2 играет значительную роль в эмбриональном развитии, Rictor-нулевые эмбрионы мышей нежизнеспособны (Shiota et al., 2006).

Ген *Dca* характерен только для подрода *Sophophora*. Предполагается, что он возник в результате дупликации с последовавшей неофункционализацией гена регукальцина (*regucalcin*) после расхождения с подродом *Drosophila*, но до радиации подрода *Sophophora* (Arboleda-Bustos, Segarra, 2011).

Помимо вида *D. melanogaster* ортологи гена *Fst* есть только у шести видов из группы *Melanogaster* (*D. sechellia*, *D. simulans*, *D. yakuba*, *D. erecta*, *D. ananassae* и *D. mauritiana*) (Bing et al., 2012). То есть два гена, кодирующие ключевые белки ответа на холодовой стресс, *Dca* и *Fst*, помимо *D. melanogaster*, имеются только у ее ближайших родственников и отсутствуют у подрода *Drosophila* (*Dca*), или даже у большей части представителей подрода *Sophophora* (*Fst*).

Описанные выше существенные особенности ответа на температурный стресс у *D. melanogaster* приводят к выводу, что данные о механизмах реакции на стресс полученные на этом модельном объекте, нужно с большой аккуратностью экстраполировать на другие организмы. Также быстрая эволюция генов, ассоциированных с ответом на температурные стрессы в недавнем прошлом *D. melanogaster*, может осложнить биоинформатический анализ основ адаптации к экстремальным условиям у немодельных двукрылых, так как гены ответа на стресс дрозофилы могут не иметь ортологов у изучаемого насекомого.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение механизмов ответа на температурные стрессы у насекомых имеет фундаментальный научный интерес и в перспективе значительное практическое применение в биотехнологии, сельском хозяйстве и в области защиты окружающей среды. Вопреки ограничениям *D. melanogaster* как модельного организма, связанным с ее отличиями в реакции на стресс, по сравнению с другими животными, данный вид остается удобной

Таблица 3. Некоторые аспекты молекулярных механизмов ответа на температурный стресс у *D. melanogaster*, требующие дальнейших исследований

Аспект	Вопросы, требующие дальнейшего исследования
Тепловой стресс	Необходимо исследовать, чем обеспечивается пик устойчивости к повторному нагреванию имаго через 60 ч после воздействия, когда экспрессия генов <i>hsp</i> и <i>Turandot</i> уже вернулась к базовому уровню (Amstrup et al., 2022). Не изучено влияние теплового стресса на состав клеточных мембран
Холодовой стресс	Требуют изучения различия в ответе на холодовой шок и косвенное холодовое воздействие; мутанты с нефункциональным белком HSF имеют нормальную устойчивость к холодовому стрессу (Amstrup et al., 2022), хотя при холодовом стрессе наблюдается денатурация белков (Košťál et al., 2004; Bischof, 2005). У <i>D. melanogaster</i> не изучена роль p38 MAPK в холодовом стрессе, у <i>Sarcophaga crassipalpis</i> неизвестна фосфорилирующая киназа и недостаточно изучены мишени протеинкиназы p38 MAPK; однозначно не установлены точные функции белков DCA и FROST
Перекрестная толерантность или компромисс?	Не исследовано, каков конкретный молекулярный механизм влияния аллельного состояния гена <i>hsp-omega</i> на устойчивость к тепловому и холодовому стрессам (Anderson et al., 2003)
Расположение генов, ассоциированных с температурными стрессами, в геноме <i>D. melanogaster</i>	Для проверки гипотезы о неслучайном расположении генов, белковые продукты которых ассоциированы с ответом на температурные стрессы, в геноме <i>D. melanogaster</i> требуется привлечение сложного статистического аппарата, увеличение выборки генов и исследование локализации обсуждаемых генов в геномах других видов <i>Drosophila</i>
Сопоставление реакции на температурные стрессы у разных жизненных стадий <i>D. melanogaster</i>	Требуют изучения причины большей выживаемости имаго при температурном стрессе, по сравнению с личинками (Jensen et al., 2007; Moghadam et al., 2019); по-видимому, требуется протестировать преимагинальные стадии на холодовое закаливание в более щадящих условиях, чем условия, созданные в работе Дженсена (Jensen et al., 2007)
Эволюционная пластичность последовательностей генов ответа на температурные стрессы	Необходимо выяснить, как давно белок HSP70 перестал принимать участие в ответе на температурный стресс у имаго предков <i>D. melanogaster</i> ; остается неясным, насколько уникальна быстрая эволюция молекулярных механизмов ответа на температурный стресс для <i>D. melanogaster</i> и какова ее роль в широком географическом распространении этого вида

экспериментальной системой благодаря отработанным методам генетической трансформации, удобствам содержания в лаборатории и широкому географическому распространению. Несмотря на достигнутый в последние десятилетия качественный прогресс в понимании механизмов реакции на температурные стрессы у насекомых в целом и *D. melanogaster* в частности, в этой области остается значительное количество вопросов, требующих дальнейших исследований. Некоторые из этих вопросов приведены в табл. 3.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность коллективу кафедры биологической эволюции биологического факультета МГУ и отдельно Александру Владимировичу Маркову

за внимательное ознакомление с нашей работой и ценные комментарии.

ИНФОРМАЦИЯ О ФИНАНСИРОВАНИИ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-00156, <https://rscf.ru/project/22-24-00156/>.

ЗАЯВЛЕНИЕ О КОНФЛИКТЕ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЭТИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Amstrup A.B., Bæk I., Loeschcke V., Givskov Sørensen J., 2022. A functional study of the role of Turandot genes in *Drosophila melanogaster*: An emerging candidate mechanism for inducible heat tolerance // J. Insect Physiol. V. 143. Art. 104456. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2022.104456>
- Anderson A.R., Collinge J.E., Hoffmann A.A., Kellett M., McKechnie S.W., 2003. Thermal tolerance trade-offs associated with the right arm of chromosome 3 and marked by the *hsp-omega* gene in *Drosophila melanogaster* // Heredity (Edinb). V. 90. P. 195–202. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800220>
- Arboleda-Bustos C.E., Segarra C., 2011. The *Dca* gene involved in cold adaptation in *Drosophila melanogaster* arose by duplication of the ancestral regucalcin gene // Mol. Biol. Evol. V. 28. P. 2185–2195. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr040>
- Arimoto K., Fukuda H., Imajoh-Ohmi S., Saito H., Takekawa M., 2008. Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways // Nat. Cell Biol. V. 10. P. 1324–1332. <https://doi.org/10.1038/ncb1791>
- Bayley M., Petersen S.O., Knigge T., Köhler H.-R., Holmstrup M., 2001. Drought acclimation confers cold tolerance in the soil collembolan *Folsomia candida* // J. Insect Physiol. V. 47. P. 1197–1204. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(01\)00104-4](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(01)00104-4)
- Benedict M.Q., Cockburn A.F., Seawright J.A., 1993. The *Hsp70* heat-shock gene family of the mosquito *Anopheles albimanus* // Insect Mol. Biol. V. 2. P. 93–102. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.1993.tb00130.x>
- Bettencourt B.R., Feder M.E., 2001. *Hsp70* duplication in the *Drosophila melanogaster* species group: How and when did two become five? // Mol. Biol. Evol. V. 18. P. 1272–1282. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003912>
- Bing X., Zhang J., Sinclair B.J., 2012. A comparison of *Frost* expression among species and life stages of *Drosophila* // Insect Mol. Biol. V. 21. P. 31–39. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2011.01108.x>
- Bischof J.C., 2005. Thermal stability of proteins // Ann. N.-Y. Acad. Sci. V. 1066. P. 12–33. <https://doi.org/10.1196/annals.1363.003>
- Bogert C.M., 1949. Thermoregulation in reptiles: A factor in evolution // Evolution. V. 3. № 3. P. 195–211. <https://doi.org/10.2307/2405558>
- Bourbon H.G., Benetah M.H., Guillou E., Mojica-Vazquez L.H., Baanannou A., et al., 2022. A shared ancient enhancer element differentially regulates the *bric-a-brac* tandem gene duplicates in the developing *Drosophila* leg // PLoS Genet. V. 18. Art. e1010083. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010083>
- Bubli O.A., Imasheva A.G., Loeschcke V., 1998. Selection for knockdown resistance to heat in *Drosophila melanogaster* at high and low larval densities // Evolution. V. 52. P. 619–625. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1998.tb01661.x>
- Campos-Ortega J.A., Hartenstein V., 1997. Stages of *Drosophila* embryogenesis // The Embryonic Development of *Drosophila melanogaster*. Berlin; Heidelberg: Springer. P. 9–102. https://doi.org/10.1007/978-3-66-22489-2_2
- Celniker S.E., Sharma S., Keelan D.J., Lewis E.B., 1990. The molecular genetics of the bithorax complex of *Drosophila*: Cis-regulation in the Abdominal-B domain // EMBO J. V. 9. P. 4277–4286. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07876.x>
- Colinet H., Fai Lee S., Hoffmann A., 2010. Functional characterization of the *Frost* gene in *Drosophila melanogaster*: Importance for recovery from chill coma // PLoS One. V. 5. Art. e10925. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010925>
- Consoulas C., Duch C., Bayline R.J., Levine R.B., 2000. Behavioral transformations during metamorphosis: Remodeling of neural and motor systems // Brain Res. Bull. V. 53. P. 571–583. [https://doi.org/10.1016/S0304-9230\(00\)00391-9](https://doi.org/10.1016/S0304-9230(00)00391-9)
- Craig C.R., Fink J.L., Yagi Y., Ip Y.T., Cagan R.L., 2004. A *Drosophila* *p38* orthologue is required for environmental stress responses // EMBO Rep. V. 5. P. 1058–1063. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400282>
- David J., Clavel M.F., 1969. Influence de la température sur le nombre, le pourcentage d'éclosion et la taille des oeufs pondus par *Drosophila melanogaster* // Ann. Soc. Entomol. Fr. V. 5. № 1. P. 161–177. <https://doi.org/10.1080/21686351.1969.12278918>
- Ekengren S., Tryselius Y., Dushay M.S., Liu G., Steiner H., Hultmark D., 2001. A humoral stress response in *Drosophila* // Curr. Biol. V. 11. P. 714–718. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00203-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00203-2)
- Feder M.E., Blair N., Figueras H., 1997. Oviposition site selection: Unresponsiveness of *Drosophila* to cues of potential thermal stress // Anim. Behav. V. 53. P. 585–588. <https://doi.org/10.1006/anbe.1996.0333>
- Fujiwara Y., Denlinger D.L., 2007. *p38* MAPK is a likely component of the signal transduction pathway triggering rapid cold hardening in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis* // J. Exp. Biol. V. 210. P. 3295–3300. <https://doi.org/10.1242/jeb.006536>
- Garbuz D.G., Yushenova I.A., Zatssepina O.G., Przhiboro A.A., Bettencourt B.R., Evgen'ev M.B., 2011. Organization and evolution of *hsp70* clusters strikingly differ in two species of Stratiomyidae (Diptera) inhabiting thermally contrasting environments // BMC Evol. Biol. V. 11. Art. 74. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-74>
- Gaunt S.J., 2015. The significance of *Hox* gene collinearity // Int. J. Dev. Biol. V. 59. P. 159–170. <https://doi.org/10.1387/ijdb.150223sg>
- Gaunt S.J., 2022. Seeking sense in the *Hox* gene cluster // J. Dev. Biol. V. 10. Art. 48. <https://doi.org/10.3390/jdb10040048>

- Goller F., Esch H., 1990. Comparative study of chill-coma temperatures and muscle potentials in insect flight muscles // J. Exp. Biol. V. 150. P. 221–231. <https://doi.org/10.1242/jeb.150.1.221>
- Goto S.G., 2000. Expression of *Drosophila* homologue of senescence marker protein-30 during cold acclimation // J. Insect Physiol. V. 46. P. 1111–1120. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(99\)00221-8](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(99)00221-8)
- Goto S.G., 2001. A novel gene that is up-regulated during recovery from cold shock in *Drosophila melanogaster* // Gene. V. 270. P. 259–264. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00465-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00465-6)
- Gupta R.S., Golding G.B., 1993. Evolution of HSP70 gene and its implications regarding relationships between archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes // J. Mol. Evol. V. 37. P. 573–582. <https://doi.org/10.1007/BF00182743>
- Hazel J., 1990. The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment // Prog. Lipid Res. V. 29. P. 167–227. [https://doi.org/10.1016/0163-7827\(90\)90002-3](https://doi.org/10.1016/0163-7827(90)90002-3)
- Hoffmann A.A., Blacket M.J., McKechnie S.W., Rako L., Schiffer M., et al., 2012. A proline repeat polymorphism of the *Frost* gene of *Drosophila melanogaster* showing clinal variation but not associated with cold resistance // Insect Mol. Biol. V. 21. P. 437–445. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2012.01149.x>
- Hosler J.S., Burns J.E., Esch H.E., 2000. Flight muscle resting potential and species-specific differences in chill-coma // J. Insect Physiol. V. 46. P. 621–627. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(99\)00148-1](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(99)00148-1)
- Hsu S., Belmouaden C., Nolte V., Schlötterer C., 2021. Parallel gene expression evolution in natural and laboratory evolved populations // Mol. Ecol. V. 30. P. 884–894. <https://doi.org/10.1111/mec.15649>
- Hunt C., Morimoto R.I., 1985. Conserved features of eukaryotic *hsp70* genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human *hsp70* // Proc. Natl Acad. Sci. V. 82. P. 6455–6459. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.19.6455>
- Hurst L.D., Pál C., Lercher M.J., 2004. The evolutionary dynamics of eukaryotic gene order // Nat. Rev. Genet. V. 5. P. 299–310. <https://doi.org/10.1038/nrg1319>
- Ikeda K., Morigasaki S., Tatebe H., Tamanoi F., Shiozaki K., 2008. Fission yeast TOR complex 2 activates the AGC-family Gad8 kinase essential for stress resistance and cell cycle control // Cell Cycle. V. 7. P. 358–364. <https://doi.org/10.4161/cc.7.3.5245>
- Inoue H., Tateno M., Fujimura-Kamada K., Takaeasu G., Adachi-Yamada T., et al., 2001. A *Drosophila* MAPKKK, D-MEKK1, mediates stress responses through activation of p38 MAPK // EMBO J. V. 20. № 19. P. 5421–5430.
- Itskovich V.B., Shigarova A.M., Glyzina O.Y., Kaluzhnaya O.V., Borovskii G.B., 2018. Heat shock protein 70 (Hsp70) response to elevated temperatures in the endemic Baikal sponge *Lubomirskia baicalensis* // Ecol. Indic. V. 88. P. 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.12.055>
- Jedlicka P., Mortin M.A., Wu C., 1997. Multiple functions of *Drosophila* heat shock transcription factor *in vivo* // EMBO J. V. 16. P. 2452–2462. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.9.2452>
- Jenkins V.K., Larkin A., Thurmond J., 2022. Using FlyBase: A database of *Drosophila* genes and genetics // *Drosophila*. Methods in Molecular Biology. V. 2540 / Ed. Dahmann C. N.-Y.: Humana. P. 1–34. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2541-5_1
- Jensen L.T., Cockerell F.E., Kristensen T.N., Rako L., Loeschck V., et al., 2010. Adult heat tolerance variation in *Drosophila melanogaster* is not related to Hsp70 expression // J. Exp. Zool. A. Ecol. Genet. Physiol. V. 313A. P. 35–44. <https://doi.org/10.1002/jez.573>
- Jensen D., Overgaard J., Sørensen J.G., 2007. The influence of developmental stage on cold shock resistance and ability to cold-harden in *Drosophila melanogaster* // J. Insect Physiol. V. 53. P. 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2006.11.008>
- Jevtov I., Zacharogianni M., Oorschot M.M., van, Zadelhoff G., van, Aguilera-Gomez A., et al., 2015. TORC2 mediates the heat stress response in *Drosophila* by promoting the formation of stress granules // J. Cell Sci. V. 128. № 14. P. 2497–2508. <https://doi.org/10.1242/jcs.168724>
- Kawasaki F., Koonce N.L., Guo L., Fatima S., Qiu C., et al., 2016. Small heat shock protein-mediated cell-autonomous and nonautonomous protection in a *Drosophila* model for environmental stress-induced degeneration // Dis. Model Mech. V. 9. № 9. P. 953–964. <https://doi.org/10.1242/dmm.026385>
- Košťál V., Vambera J., Basl J., 2004. On the nature of pre-freeze mortality in insects: Water balance, ion homeostasis and energy charge in the adults of *Pyrhocoris apterus* // J. Exp. Biol. V. 207. P. 1509–1521. <https://doi.org/10.1242/jeb.00923>
- Krebs R.A., Feder M.E., 1997. Natural variation in the expression of the heat-shock protein hsp70 in a population of *Drosophila melanogaster* and its correlation with tolerance of ecologically relevant thermal stress // Evolution. V. 51. P. 173–179. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1997.tb02398.x>
- Krebs R.A., Loeschcke V., 1994. Effects of exposure to short-term heat stress on fitness components in *Drosophila melanogaster* // J. Evol. Biol. V. 7. P. 39–49. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.1994.7010039.x>
- Leemans R., Egger B., Loop T., Kammermeier L., He H., et al., 2000. Quantitative transcript imaging in normal and heat-shocked *Drosophila* embryos by using high-density oligonucleotide arrays // Proc. Natl Acad. Sci. V. 97. P. 12138–12143. <https://doi.org/10.1073/pnas.210066997>

- Lehmann P., Ammunet T., Barton M., Battisti A., Eigenbrode S.D., et al., 2020. Complex responses of global insect pests to climate warming // *Front. Ecol. Environ.* V. 18. P. 141–150.
<https://doi.org/10.1002/fee.2160>
- Lerman D.N., Feder M.E., 2001. Laboratory selection at different temperatures modifies heat-shock transcription factor (HSF) activation in *Drosophila melanogaster* // *J. Exp. Biol.* V. 204. P. 315–323.
<https://doi.org/10.1242/jeb.204.2.315>
- Li F., Xia J., Li J., Liu S., Wang X., 2012. p38 MAPK is a component of the signal transduction pathway triggering cold stress response in the MED cryptic species of *Bemisia tabaci* // *J. Integr. Agric.* V. 11. P. 303–311.
[https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(12\)60014-8](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(12)60014-8)
- Loker R., Mann R.S., 2022. Divergent expression of paralogous genes by modification of shared enhancer activity through a promoter-proximal silencer // *Curr. Biol.* V. 32. P. 3545–3555.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.06.069>
- MacMillan H.A., Walsh J.P., Sinclair B.J., 2009. The effects of selection for cold tolerance on cross-tolerance to other environmental stressors in *Drosophila melanogaster* // *Insect Sci.* V. 16. P. 263–276.
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2009.01251.x>
- McColl G., Hoffmann A.A., McKechnie S.W., 1996. Response of two heat shock genes to selection for knock-down heat resistance in *Drosophila melanogaster* // *Genetics.* V. 143. P. 1615–1627.
<https://doi.org/10.1093/genetics/143.4.1615>
- Merkey A.B., Wong C.K., Hoshizaki D.K., Gibbs A.G., 2011. Energetics of metamorphosis in *Drosophila melanogaster* // *J. Insect Physiol.* V. 57. P. 1437–1445.
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.07.013>
- Moghadam N.N., Ketola T., Pertoldi C., Bahrndorff S., Kristensen T.N., 2019. Heat hardening capacity in *Drosophila melanogaster* is life stage-specific and juveniles show the highest plasticity // *Biol. Lett.* V. 15. Art. 20180628.
<https://doi.org/10.1098/rsbl.2018.0628>
- Morrow G., Heikkilä J.J., Tanguay R.M., 2006. Differences in the chaperone-like activities of the four main small heat shock proteins of *Drosophila melanogaster* // *Cell Stress Chaperones.* V. 11. P. 51–60.
<https://doi.org/10.1379/CSC-166.1>
- Nielsen M.M., Overgaard J., Sørensen J.G., Holmstrup M., Justesen J., Loeschcke V., 2005. Role of HSF activation for resistance to heat, cold and high-temperature knock-down // *J. Insect Physiol.* V. 51. P. 1320–1329.
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2005.08.002>
- Newman C.E., Toxopeus J., Udaka H., Ahn S., Martynowicz D.M., et al., 2017. CRISPR-induced null alleles show that Frost protects *Drosophila melanogaster* reproduction after cold exposure // *J. Exp. Biol.* V. 220. № 18. P. 3344–3354.
<https://doi.org/10.1242/jeb.160176>
- Ohtsuki S., Levine M., Cai H.N., 1998. Different core promoters possess distinct regulatory activities in the *Drosophila* embryo // *Genes Dev.* V. 12. P. 547–556.
<https://doi.org/10.1101/gad.12.4.547>
- Overgaard J., Tomčala A., Sørensen J.G., Holmstrup M., Krogh P.H., et al., 2008. Effects of acclimation temperature on thermal tolerance and membrane phospholipid composition in the fruit fly *Drosophila melanogaster* // *J. Insect Physiol.* V. 54. P. 619–629.
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.12.011>
- Parida S., Mishra S.R., Mishra C., Mohapatra S., Dalai N., et al., 2020. Impact of heat stress on transcriptional abundance of HSP70 in cardiac cells of goat // *Anim. Biotechnol.* V. 31. P. 223–228.
<https://doi.org/10.1080/10495398.2019.1583574>
- Salehipour-shirazi G., Ferguson L.V., Sinclair B.J., 2017. Does cold activate the *Drosophila melanogaster* immune system? // *J. Insect Physiol.* V. 96. P. 29–34.
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.10.009>
- Shamovsky I., Nudler E., 2008. New insights into the mechanism of heat shock response activation // *Cell. Mol. Life Sci.* V. 65. P. 855–861.
<https://doi.org/10.1007/s00018-008-7458-y>
- Shilova V.Y., Zatsepina O.G., Garbuz D.G., Funikov S.Y., Zelentsova E.S., et al., 2018. Heat shock protein 70 from a thermotolerant Diptera species provides higher thermoresistance to *Drosophila* larvae than correspondent endogenous gene // *Insect Mol. Biol.* V. 27. P. 61–72.
<https://doi.org/10.1111/imb.12339>
- Shiota C., Woo J.-T., Lindner J., Shelton K.D., Magnusson M.A., 2006. Multiallelic disruption of the *ric1* gene in mice reveals that mTOR complex 2 is essential for fetal growth and viability // *Dev. Cell.* V. 11. P. 583–589.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.08.013>
- Sinclair B.J., 2000. Water relations of the freeze-tolerant New Zealand alpine cockroach *Celatoblatta quinque-maculata* (Dictyoptera: Blattidae) // *J. Insect Physiol.* V. 46. P. 869–876.
[https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(99\)00193-6](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(99)00193-6)
- Sinclair B.J., Gibbs A.G., Roberts S.P., 2007. Gene transcription during exposure to, and recovery from, cold and desiccation stress in *Drosophila melanogaster* // *Insect Mol. Biol.* V. 16. P. 435–443.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2007.00739.x>
- Sinclair B.J., Roberts S.P., 2005. Acclimation, shock and hardening in the cold // *J. Therm. Biol.* V. 30. P. 557–562.
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2005.07.002>
- Sørensen J.G., Nielsen M.M., Kruhöffer M., Justesen J., Loeschcke V., 2005. Full genome gene expression analysis of the heat stress response in *Drosophila melanogaster* // *Cell Stress Chaperones.* V. 10. Art. 312.
<https://doi.org/10.1379/CSC-128R1.1>
- Sørensen J.G., Nielsen M.M., Loeschcke V., 2007. Gene expression profile analysis of *Drosophila melanogaster* selected for resistance to environmental stressors //

- J. Evol. Biol. V. 20. P. 1624–1636.
<https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2007.01326.x>
- Stocker H., Gallant P., 2008. Getting Started // *Drosophila*. Methods in Molecular Biology. V. 420 / Ed. Dahmann C. Totowa: Humana Press. P. 27–44.
https://doi.org/10.1007/978-1-59745-583-1_2
- Su Q., Li S., Shi C., Zhang J., Zhang G., et al., 2018. Implication of heat-shock protein 70 and UDP-glucuronosyltransferase in thiamethoxam-induced whitefly *Bemisia tabaci* thermotolerance // J. Pest Sci. V. 91. P. 469–478.
<https://doi.org/10.1007/s10340-017-0880-x>
- Tsvetkova N.M., Horváth I., Török Z., Wolkers W.F., Balogi Z., et al., 2002. Small heat-shock proteins regulate membrane lipid polymorphism // Proc. Natl Acad. Sci. V. 99. P. 13504–13509.
<https://doi.org/10.1073/pnas.192468399>
- Weisman R., Choder M., 2001. The fission yeast TOR homolog, *tor1+*, is required for the response to starvation and other stresses via a conserved serine // J. Biol. Chem. V. 276. P. 7027–7032.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M010446200>
- Xu K., Niu Q., Zhao H., Du Y., Guo L., Jiang Y., 2018. Sequencing and expression characterization of antifreeze protein maxi-like in *Apis cerana cerana* // J. Insect Sci. V. 18.
<https://doi.org/10.1093/jisesa/iex109>
- Yoder J.A., Benoit J.B., Denlinger D.L., Rivers D.B., 2006. Stress-induced accumulation of glycerol in the flesh fly, *Sarcophaga bullata*: Evidence indicating anti-desiccant and cryoprotectant functions of this polyol and a role for the brain in coordinating the response // J. Insect Physiol. V. 52. P. 202–214.
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2005.10.005>

Molecular genetic mechanisms underlying the response to heat and cold stress in *Drosophila melanogaster*

D. S. Neizvestny*, E. Y. Yakovleva

Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Department of Biological Evolution

Leninskie gory, 1, Moscow, 119991 Russia

*E-mail: neizvestny.ds@do-student.ru

Molecular mechanisms of stress response are interesting from an evolutionary point of view, as they are often under natural selection. In this study, we reviewed the molecular mechanisms of reaction to temperature stresses on the example of a model organism *Drosophila melanogaster*, which had been studied in detail. We compared the reactions to heat and cold stresses and identified similar and specific molecular response mechanisms. The key processes common to responses to both types of stress were the increased expression of the HSP (heat shock proteins) and Turandot genes and the activation of serine-threonine protein kinase p38 MAPK. Heat stress also induced TORC2-mediated formation of stress granules, but cold stress led to the increase in the synthesis of calcium-binding protein DCA and cryoprotective protein FROST. Some similarity in reactions to heat and cold stress can be explained by the similar nature of the damage induced by these stresses and the multifunctionality of the proteins that provide stress responses. Probably, there was an evolutionary trade-off between tolerance to heat and cold stress in *D. melanogaster*: an increase in resistance to one stress has led to a decrease in resistance to another. Fruit flies at different life cycle stages demonstrated different sensitivity to temperature influences, and the mechanisms of response to them also partially differed. The comparison of the studies on the evolution of proteins involved in response to temperature stresses allowed us to conclude that these molecular mechanisms evolved rapidly in insects, and the conclusions obtained on *D. melanogaster* should be transferred to other animals, even within the Diptera, with great caution. Using the FlyBase database, we examined the localization of genes whose products were involved in response to temperature stresses in the *Drosophila* genome. 15 out of the 21 genes mentioned in the work were located on the third chromosome, 10 on its right arm. That allowed us to hypothesize an adaptive convergence of these genes in the genome of *D. melanogaster*. Perhaps this helped synchronize the regulation of their expression more precisely. Understanding the molecular mechanisms of insect response to temperature stresses can be of practical importance: to help predict the changes in the species' habitat and their adaptation to rapidly changing climate conditions, as well as to contribute to the development of insecticides that can withstand insect pests and invasive species.