doi 10.18699/bgrs2026-289

Солевая преадаптация индуцирует перекрёстную стресс-толерантность у личинок енисейского горбоносого сига (*Coregonus fluviatilis* Isachenko) по данным RNA-Seq

Епифанцев А.А.[1]*, Вахтеева Е.А.[1], Королева А.Г.[1], Сидорова Т.В.[1], Потапов С.А.[1], Суханова Л.В.[1], Глызина О.Ю.[1], Дидоренко С.И.[2], Этингова А.А.[2], Сапожникова Ю.П.[1]
[1] *Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, Россия*
[2] *Байкальский музей СО РАН, Иркутск, Россия*
* *epifantsevalexander@yandex.ru*

Ключевые слова: енисейский горбоносый сиг; озеро Байкал; температурный стресс; солевой стресс; дифференциальная экспрессия генов; транскриптомика; RNA-seq; перекрестная толерантность

Мотивация и цель: Температурный и солевой стресс относятся к числу наиболее значимых абиотических факторов, определяющих рост, развитие и физиологическое состояние водных организмов. Температурный стресс оказывает существенное влияние на рыб, особенно на холодолюбивые виды. На молекулярном уровне отклонение от температурного оптимума вызывает окислительный стресс и денатурацию белков, что приводит к развитию протеотоксического стресса – накоплению неправильно свёрнутых и агрегированных белков, нарушающему клеточный гомеостаз [1, 2]. У пресноводных рыб повышение солёности нарушает водно-солевой баланс, увеличивая осмотический градиент и требуя дополнительных энергозатрат на поддержание ионного гомеостаза, а также индуцирует окислительный стресс, иммунный дисбаланс и метаболические нарушения. Объектом исследования данной работы служат личинки енисейского горбоносого сига (*Coregonus fluviatilis*, Isachenko, 1925) – озерно-речного вида, что делает его интересной моделью для изучения осморегуляторной пластичности и адаптационных возможностей у сиговых рыб в целом. Эффект солевой преадаптации в данной работе был исследован как инструмент индукции перекрестной толерантности к температурному стрессу. Цель работы – выявить транскриптомные изменения и ключевые молекулярные механизмы адаптации личинок к солевому и тепловому стрессу, а также оценить влияние солевой преадаптации на последующий стресс-ответ. Особый интерес представляет перекрёстная толерантность, при которой адаптация к одному фактору (солёность) повышает устойчивость к другому (температура) за счёт активации общих защитных механизмов. Предполагается, что предварительная адаптация к повышенной солёности облегчает протекание последующего острого температурного стресса у личинок сига за счёт снижения протеотоксического стресса и перераспределения ресурсов в сторону HSR (heat shock response).
Методы и алгоритмы: Работы выполнялись на базе УНУ «Экспериментальный пресноводный аквариумный комплекс байкальских гидробионтов» ЛИН СО РАН. Солевая преадаптация личинок заключалась в постепенном повышении солёности до 4 ‰ в течение месяца (на 1 ‰ в неделю). Личинки, прошедшие солевую преадаптацию, и контрольные содержались при температуре 7–8 °C. По достижении личинками месячного возраста часть предварительно адаптированных и контрольных групп были подвержены острым стресс-факторам: сублетальный температурный стресс (до 24 °C в течение 2 часов), солевой стресс (10 ‰ в течение 2 часов). Всего было проанализировано 6 групп личинок: C – интактный контроль, SA – солевая преадаптация, TS – острый температурный стресс, SA+TS – солевая преадаптация с последующим острым температурным стрессом, SS – острый солевой стресс, SA+SS – солевая преадаптация с последующим острым солевым стрессом. После секвенирования RNA-Seq (Illumina NovaSeq 6000) была проведена *de novo* сборка транскриптома (Trinity v.2.13.2) [4]. Для идентификации дифференциально экспрессирующихся генов использовались программы edgeR [3], Bowtie2 v2.3.5.1 и Trinity v2.8.5. Аннотация генов проводилась с помощью UniProtKB/SwissProt. Обогащение генов исследовалось с использованием баз GO и KEGG. Для валидации транскриптома использовали метод qPCR.
Результаты: Анализ профилей экспрессии выявил чёткую дифференциацию транскрипционных ответов между группами. В группе, подвергнутой острому температурному стрессу без преадаптации (до 24°C) (TS), наблюдалась выраженная активация генов, связанных с пищеварением и протеолизом: pepsin A-5 preprotein, acidic mammalian chitinase, gastricsin, chymotrypsin-like, carboxypeptidase A4, а также trypsin-1, α-amylase, elastase 2 и другие предшественники пищеварительных протеаз. Одновременно была отмечена активация классического ответа на тепловой шок: повышение экспрессии генов белков теплового шока (HSP70, HSC71), а также некоторых факторов транскрипции (JunB, C/EBP-beta, C/EBP-delta). Напротив, в контрольной группе без адаптации (C) экспрессия большинства из этих генов была подавлена. Солевая преадаптация (SA) вызывала умеренное повышение экспрессии белков протеолиза, однако экспрессия HSP70 и HSC71 осталась на уровне контрольных значений. В группе с предварительной солевой адаптацией, подвергнутой температурному стрессу (SA+TS), активация HSP-70 и HSC71 достигла максимальных значений, что говорит о мощном протекторном ответе. Также отмечена значительная активация транскрипционных факторов: C/EBP-beta, C/EBP-beta, JunB, а также DDIT4. При этом, уровень экспрессии генов протеолитических белков был лишь умеренно повышен

в отличие от группы острого стресса без адаптации, и в большинстве случаев оставался пониженным. Таким образом, предварительная солевая адаптация смягчает протеотоксический стресс, смещая клеточный ответ с деградации белков в сторону усиления защитных механизмов за счет белков теплового шока и факторов транскрипции, обеспечивающих выживание клеток в условиях температурного стресса (перекрестная толерантность). В группах, подвергнутых солевому стрессу (10 ‰) (SS и SA+SS), выраженных изменений экспрессии большинства анализируемых генов не наблюдалось, за исключением слабой активации chitinase и hemopexin в преадаптированной группе. На основании этого можно предположить, что воздействие солёности 10 ‰ в течение 2 часов не вызывает масштабных транскрипционных перестроек у данного вида. Не исключено, что ответ реализуется на посттрансляционном уровне через регуляцию активности ион-транспортных белков.
Выводы: Солевая преадаптация личинок енисейского горбоносого сига индуцирует состояние перекрёстной толерантности к температурному стрессу, которое характеризуется смещением транскрипционного ответа с активации протеолитических генов на усиление экспрессии белков теплового шока (HSP70, HSC71) и стресс-ассоциированных факторов транскрипции (JunB, C/EBP-beta, C/EBP-delta, DDIT4). Предварительная солевая адаптация сама по себе умеренно активирует гены протеолиза, но не запускает HSP-ответ. В отличие от температурного стресса, кратковременное воздействие солёности 10 ‰ не вызывает масштабных транскрипционных изменений, что может быть связано с недостаточным временем воздействия (2 часа) для развития полноценного транскрипционного ответа, либо указывает на возможную роль посттрансляционных механизмов в осморегуляции у данного вида.
Финансирование: Исследование выполнено при поддержке РНФ № 25-24-00634 (https://rscf.ru/project/25-24-00634).

Salinity preadaptation induces cross-stress tolerance in the Yenisei hump-nosed whitefish larvae according to RNA-seq data

Epifantsev A.A.[1]*, Vakhteeva E.A.[1], Koroleva A.G.[1], Sidorova T.V.[1], Potapov S.A.[1], Sukhanova L.V.[1], Glyzina O.Yu.[1], Didorenko S.I.[2], Etingova A.A.[2], Sapozhnikova Yu.P.[1]
[1] *Limnological Institute, SB RAS, Irkutsk, Russia*
[2] *Baikal Museum SB RAS, Irkutsk, Russia*
* *epifantsevalexander@yandex.ru*

Key words: Yenisei hump-nosed whitefish; Lake Baikal; thermal stress; HSR; salinity stress; differential gene expression; transcriptomics; RNA-seq; cross-tolerance

Motivation and Aim: Temperature and salinity stress are among the most significant abiotic factors determining the growth, development, and physiological status of aquatic organisms. Temperature stress has a substantial influence on fish, particularly on cold-water species. At the molecular level, deviation from the temperature optimum induces oxidative stress and protein denaturation, leading to the development of proteotoxic stress – the accumulation of misfolded and aggregated proteins that disrupts cellular homeostasis [1,2]. In freshwater fish, increased salinity disrupts the water–salt balance, elevating the osmotic gradient and requiring additional energy expenditure to maintain ion homeostasis, while also inducing oxidative stress, immune imbalance, and metabolic disturbances. The object of this study is the larvae of the Yenisei hump-nosed whitefish (*Coregonus fluviatilis*, Isachenko, 1925), a lake–river species, which makes it an interesting model for studying osmoregulatory plasticity and adaptive capabilities in coregonid fish in general. In this work, the effect of salinity preadaptation was investigated as a tool for inducing cross-tolerance to thermal stress. The aim of this work is to identify transcriptomic changes and the key molecular mechanisms of larval adaptation to salinity and thermal stress, as well as to assess the effect of salinity preadaptation on the subsequent stress response. Of particular interest is the phenomenon of cross-tolerance, whereby adaptation to one factor (salinity) enhances resistance to another (temperature) through the activation of common protective mechanisms. It is hypothesized that prior adaptation to elevated salinity alleviates the course of subsequent acute thermal stress in the Yenisei hump-nosed whitefish larvae by reducing proteotoxic stress and redirecting resources to the heat shock response (HSR).
Methods and Algorithms: All work was carried out at the Experimental Freshwater Aquarium Complex for Baikal Hydrobionts at the Limnological Institute SB RAS. Salinity preadaptation of the larvae consisted of a gradual increase in salinity to 4 ‰ over one month (1 ‰ per week). Preadapted and control larvae were maintained at a temperature of 7–8 °C. When the larvae reached one month, a subset of the preadapted and control groups were subjected to acute stressors: sublethal thermal stress (up to 24 °C for 2 hours) and salinity stress (10 ‰ for 2 hours). A total of six larval groups were analysed: C – intact control, SA – salinity preadaptation, TS – acute thermal stress, SA+TS – salinity preadaptation followed by acute thermal stress, SS – acute salinity stress, and SA+SS – salinity preadaptation followed by acute salinity stress. Following RNA-Seq (Illumina NovaSeq 6000), a *de novo* transcriptome assembly was performed using Trinity v.2.13.2 [4]. Differential expression analysis was carried out using edgeR [3], Bowtie2 v2.3.5.1, and Trinity v2.8.5. Gene annotation was performed using UniProtKB/SwissProt. Gene enrichment was investigated using GO and KEGG databases. Transcriptomic data were validated by qPCR.

Results: Analysis of expression profiles revealed a clear differentiation of transcriptional responses among the groups. In the group subjected to acute thermal stress without preadaptation (up to 24 °C) (TS), pronounced activation of genes associated with digestion and proteolysis was observed: pepsin A-5 preprotein, acidic mammalian chitinase, gastricsin, chymotrypsin-like, carboxypeptidase A4, as well as trypsin-1, α-amylase, elastase 2, and other digestive protease precursors. Simultaneously, activation of the classical HSR was noted: increased expression of heat shock protein genes (HSP70, HSC71), along with several transcription factors (JunB, C/EBP-beta, C/EBP-delta). In contrast, in the non-adapted control group (C), the expression of most of these genes was suppressed. Salinity preadaptation (SA) caused a moderate increase in the expression of proteolytic proteins, whereas the expression of HSP70 and HSC71 remained at control levels. In the group with prior salinity adaptation followed by thermal stress (SA+TS), the activation of HSP70 and HSC71 reached its maximum, indicating a potent protective response. Significant activation of the transcription factors C/EBP-beta, JunB, and DDIT4 was also noted. At the same time, the expression level of proteolytic protein genes was only moderately elevated compared with the acute stress group without adaptation and, in most cases, remained suppressed. Thus, prior salinity adaptation mitigates proteotoxic stress, shifting the cellular response from protein degradation towards the enhancement of protective mechanisms due to heat shock proteins and transcription factors that ensure cell survival under thermal stress (cross-tolerance). In the groups subjected to salinity stress (10 ‰) (SS and SA+SS), no pronounced changes in the expression of most analysed genes were observed, except for weak activation of chitinase and hemopexin in the preadapted group. Based on this fact, it can be hypothesised that exposure to salinity of 10 ‰ for 2 hours does not induce large-scale transcriptional rearrangements in this species. It is possible that the response is realised at the post-translational level through the regulation of ion transporter activity.
Conclusion: Salinity preadaptation of the Yenisei hump-nosed whitefish larvae induces a state of cross-tolerance to thermal stress, which is characterised by a shift in the transcriptional response from the activation of proteolytic genes towards enhanced expression of heat shock proteins (HSP70, HSC71) and stress-associated transcription factors (JunB, C/EBP-beta, C/EBP-delta, DDIT4). Prior salinity adaptation alone moderately activates proteolytic genes but does not trigger an HSR. In contrast to thermal stress, short-term exposure to a salinity of 10 ‰ does not induce large-scale transcriptional changes, which may be due to the insufficient exposure time (2 hours) for a full transcriptional response to develop, or otherwise suggests a possible role for post-translational mechanisms in osmoregulation in this species.
Funding: This research was funded by the Russian Science Foundation, grant No. RSF 25-24-00634 (https://rscf.ru/project/25-24-00634).

Список литературы/References

1. Sapozhnikova Y.P. et al. Transcriptional Rearrangements Associated with Thermal Stress and Preadaptation in Baikal Whitefish (*Coregonus baicalensis*). *Animals* 2024, 14: 3077.
2. Koroleva A.G. et al. Acclimation during Embryogenesis Remodulates Telomerase Activity and Gene Expression in Baikal Whitefish Larvae, Mitigating the Effects of Acute Temperature Stress. *Animals* 2024, 14: 2839.
3. Chen Y., Lun A. T. L. and Smyth G. K. “From reads to genes to pathways: differential expression analysis of RNA-Seq experiments using Rsubread and the edgeR quasi-likelihood pipeline.”*F1000Research* 5 2016: 1438.
4. Haas, Brian J., et al. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature protocols* 8.8 2013: 1494-1512.