

Škola doktorských studií v biologických vědách Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta

Mechanismy působení nízkomolekulárních a  
vysokomolekulárních cyto-protektivních látek při  
vystavení hmyzího organismu nízkým teplotám.

Disertační práce

**Mgr. Petr Hůla**

Školitel: prof. Ing. Vladimír Košťál, CSc.

BC AVČR, Entomologický ústav

České Budějovice 2022

## **Doporučená forma citace:**

Hůla, P. (2022). Mechanismy působení nízkomolekulárních a vysokomolekulárních cyto-  
protektivních látek při vystavení hmyzího organismu nízkým teplotám. (The mechanism of  
low-molecular-weight and high-molecular-weight cyto-protective compounds in insects  
exposed to low temperatures. *Ph.D. Thesis in Czech*). University of South Bohemia, Faculty  
of Science, School of Doctoral Studies in Biological Sciences, České Budějovice, Czech  
Republic, 125 pp.

## **Anotace**

Low temperatures limit the viability of cells, tissues and whole organisms. Temperate and polar insects overwinter with body temperatures below 0°C, sometimes with ice crystals in their hemolymph. Extracellular freezing is linked with cell osmotic dehydration. Thus, the freeze-tolerant insects had to evolve complex adaptation, including seasonal accumulation of low- and high-molecular substances, to protect their tissues against deleterious effects of cell freeze-dehydration. The mechanisms by which different substances exert their cryoprotective roles are theoretically diverse but practically poorly studied. In this thesis, I present results of metabolomic and transcriptomic analyses of putative cryoprotectants in the freeze-tolerant larvae of drosophilid fly, *Chymomyza costata* that accumulate in their hemolymph and tissues in response to cooling and drying. The functional aspects of low- (mainly proline and trehalose) and high- molecular substances (mainly LEA-like proteins) are considered.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem autorem této disertační práce a že jsem ji vypracoval pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů

České Budějovice 11.11.2022



Petr Hůla

## **Afilie**

Tato práce vznikla za podpory Entomologického ústavu, BC AVČR, a Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.



## **Finanční podpora**

GAČR, 19-13381S, 2018-2022

GAJU, RNDr. Petr Nguyen, Ph.D., 2017-2021

Rozpočet RVO, Katedra zoologie, Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, prof. Ing. Vladimír Košťál, CSc., 2017-2022

ABERA, CZ.02.2.69/0.0/0.0/18\_054/0014649, 2021

## Poděkování

Na začátek bych rád poděkoval všem, kteří mě na mojí cestě doktorským studiem podporovali ve chvílích, kdy jsem chtěl vše vzdát a dát se na cestu truhláře či kuchaře.

Děkuji Danovi Sojkovi za vedení při pomoci s výrobou rekombinantních proteinů v bakteriální vektorech, stejně jako za přátelské přijetí do laboratoře imunologie vektorů.

Dále děkuji všem starým i současným kolegům naší laboratoře, díky kterým se vždy udržovala na pracovišti rodinná atmosféra.

Hlavní díky však patří mému školiteli a „vědeckému otci“ Vládovi Košťálovi, který je nejen vynikajícím vědcem světového významu, ale především dobrým, srdečným, empatickým člověkem a životním mentorem i mimo laboratoř. Bez jeho trpělivosti, motivace, společných rozhovorů a komentářů by tato práce nemohla vzniknout v takovém rozsahu a složitosti.

## Seznam publikací a autorský podíl

Disertační práce je založena na následujících publikacích (řazeno chronologicky):

- I. Des Marteaux, L. E., Hůla, P., & Košťál, V. (2019). Transcriptional analysis of insect extreme freeze tolerance. *Proceedings of the Royal Society B*, 286(1913), 20192019.

*Podílel jsem se plánování experimentů. Provedl jsem chov, aklimaci a odběr vzorků larev C. costata jednak pro hlavní experiment (3 vzorky, každý ve 3 opakováních pro RNAseq) a také pro rozšířený validační experiment (15 vzorků, každý ve čtyřech opakováních pro qRT-PCR). Provedl jsem izolaci celkové RNA ze všech vzorků (celkem 69 vzorků), ošetření DNázou, a kontrolu kvality RNA pomocí analýzy na agarózovém gelu. U všech vzorků jsem provedl validační analýzu výsledků RNAseq pomocí qRT-PCR. Celkem jsem analyzoval relativní četnosti u 4 referenčních genů a 15 dalších vybraných genů (v publikaci jsou tyto výsledky uvedeny v obrázku Fig. 3b-d a v elektronickém suplementu v obrázcích Fig. S2 a S11, S12, S13). Dále jsem provedl analýzu přežití aklimovaných larev v kapalném dusíku (v publikaci Fig. 3a). Účastnil jsem se přípravy článku, psaní vybraných částí metodiky a editaci textu. 60%*

- II. Hůla, P., Moos, M., Des Marteaux, L., Šimek, P., & Košťál, V. (2022). Insect cross-tolerance to freezing and drought stress: role of metabolic rearrangement. *Proceedings of the Royal Society B*, 289(1976), 20220308.


*Podílel jsem se na koncepční přípravě studie a na plánování jednotlivých experimentů. Provedl jsem chov, aklimaci, odběry vzorků a všechny experimenty s larvami C. costata. Extrahoval jsem larvy pro metabolomickou analýzu, která byla provedena v laboratoři analytické biochemie ENTÚ (Moos, Šimek). Hodnotil jsem výsledky experimentů statistickými metodami, podílel jsem se na interpretaci výsledků a přípravě výstupů. Podílel jsem se na psaní článku. 70%*

- III. Kučera, L., Moos, M., Štětina, T., Korbelová, J., Vodrážka, P., Des Marteaux, L., ... & Košťál, V. (2022). A mixture of innate cryoprotectants is key for freeze tolerance and cryopreservation of a drosophilid fly larva. *Journal of Experimental Biology*, 225(8), jeb243934.

*Podílel jsem se plánování experimentů. Provedl jsem chov a aklimace larev C. costata. Provedl jsem pitvy tkání (hemolymfa, tukové těleso, sval, střední střevo) aklimovaných larev a extrahoval metabolity pro metabolomické analýzy. Dále jsem se podílel na plánování a provedení experimentů s larvami krměnými na dietách obohacených různými metabolity a jejich směsmi (toxicita, výběr vhodných koncentrací pro experiment, odběr larev, extrakce metabolitů a analýza přežití v kapalném dusíku). 20%*

## **Prohlášení o autorském podílu**

prof. Ing. Vladimír Košťál, CSc., který je spoluautorem všech článků plně souhlasí s uvedenými podíly Petra Hůly na těchto článcích.



V Českých Budějovicích dne 11.11.2022

prof. Ing. Vladimír Košťál, CSc.

# Obsah

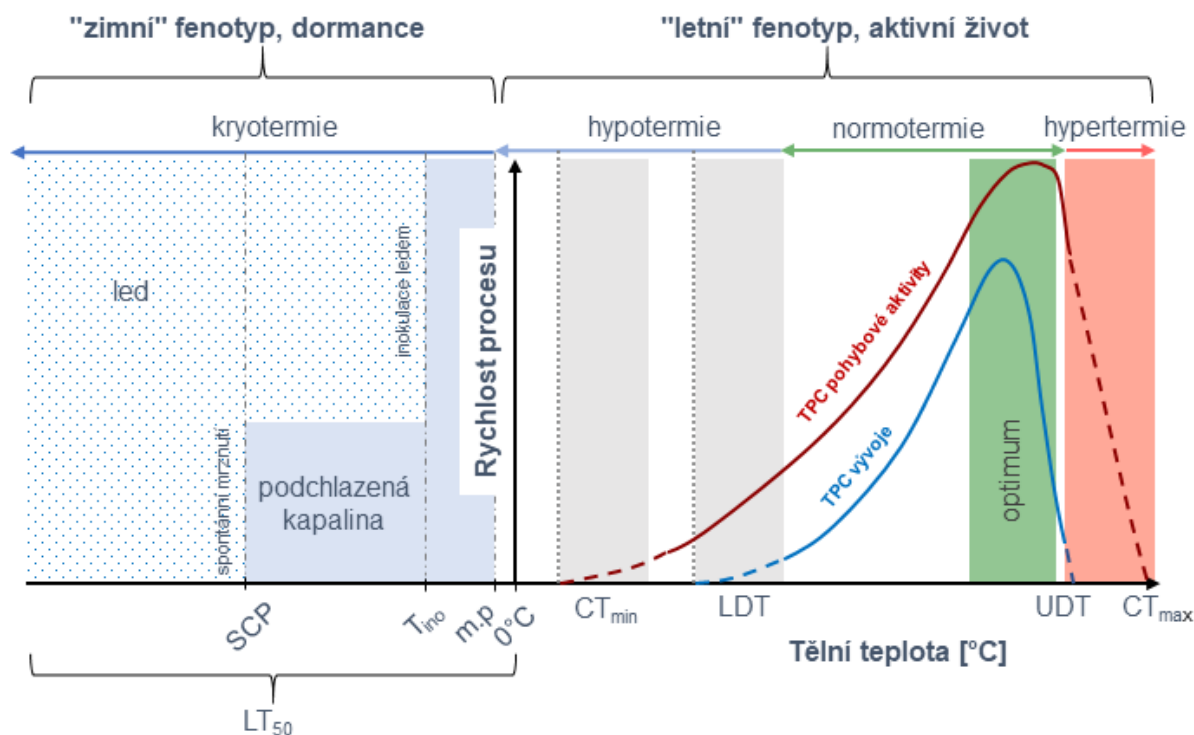
1. Úvod.....	1
2. Literární přehled.....	5
2.1. Adaptivní komplex chladové odolnosti hmyzu.....	5
2.1.1. Vstup do dormantního stavu.....	5
2.1.2. Fázové stavy vody.....	6
2.1.3. Restrukturalizace biologických membrán.....	7
2.1.4. Oxidativní stres.....	8
2.1.5. Nízkomolekulární kryoprotektivní látky.....	9
2.1.6. Expres specifických proteinů.....	13
2.1.7. LEA proteiny.....	15
2.2. Mrazová vs. evaporační dehydratace, cross tolerance.....	22
2.3. Modelový druh.....	26
2.3.1. Larvální diapauza <i>Chymomyza costata</i> .....	26
2.3.2. Chladová odolnost <i>C. costata</i> .....	28
3. Cíle disertační práce.....	32
4. Výsledky disertační práce.....	33
4.1. Publikace č. 1.....	33
4.2. Dosud nepublikované výsledky navazující na publikaci č. 1.....	37
4.2.1. Sekvenování kontigů Seq60138 a Seq102667.....	37
4.2.2. Hledání sekvencí LEA-like proteinů v transkriptomu <i>C. costata</i> .....	38
4.2.3. Dohledání výsledku pro LEA-like sekvence <i>C. costata</i> v RNAseq analýze publikace č. 1.....	41
4.2.4. Ověření sekvencí LEA-like kontigů <i>C. costata</i> .....	41
4.2.5. Podobnost Ccos LEA3-like proteinu ostatním živočišným LEA3 proteinům.....	44
4.2.6. 3D struktura Ccos LEA3-like proteinu.....	46
4.2.7. Expresní profil Ccos LEA3-like genu v larvách <i>C. costata</i> .....	53
4.2.8. Expres rekombinantního Ccos LEA3-like proteinu v bakteriálním expresním systému.....	55
4.2.9. Výroba myší protilátky specifické proti Ccos LEA3-like proteinu.....	56
4.3. Publikace č. 2.....	58
4.4. Publikace č. 3.....	61
5. Diskuse.....	64
5.1. Transkriptomická aklimační odpověď larev <i>C. costata</i> na chlad.....	64

5.2. Detekce LEA3-like proteinu u <i>C. costata</i> .....	66
5.3. Metabolomická odpověď larev <i>C. costata</i> na aklimace v suchu a chladu.....	66
5.4. Funkční analýza kryoprotektivní směsi <i>C. costata</i> .....	69
6. Závěry.....	72
7. Reference.....	73
8. Přílohy .....	89
Příloha 1.....	89
Příloha 2.....	99
Příloha 3.....	107



## 1. Úvod

Zástupci třídy Hmyz patří mezi ektotermní organismy. To znamená, že jsou schopni jen omezeně regulovat svojí tělesnou teplotu, a proto fitness a přežití hmyzích populací jsou přímo ovlivněny změnami teploty v prostředí. Teplota prostředí ovlivňuje všechny aspekty života hmyzu: od vývoje, růstu a chování, až po kinetiku biochemických procesů a molekulárních interakcí. Kromě náhodných fluktuací se teplota prostředí mění cyklicky, a to na bázi denních a sezónních cyklů. Všeobecně jsou sezónní výkyvy teplot poměrně malé v oblastech rovníku a s přibývajícím zeměpisnou šířkou se zvětšují. Druhy hmyzu, žijící ve vyšších zeměpisných šířkách jsou tak vystavené citelně výraznějším sezónním změnám teploty a také dokážou lépe odolávat teplotním extrémům (Sunday a kol., 2011). Termální limity pro přežití a fitness a jejich sezónní plasticita jsou všeobecně považovány za faktory, které determinují geografické rozšíření druhů hmyzu ve směru od rovníku k pólům a rovněž určují změny jeho druhových areálů v reakci na globální změny klimatu (Sunday a kol., 2012). V temperátních a polárních oblastech je sezónní nízká teplota jednou z hlavních překážek, kterým hmyz musí čelit. Nízká teplota limituje životaschopnost buněk, tkání a celých organismů. To je triviální fakt, pro který věda překvapivě dosud nemá plné mechanistické vysvětlení. Příčinou je komplexita působení nízké teploty na živý objekt. Nízká teplota totiž působí na všechny jeho molekuly, struktury, procesy a aktivity zároveň. Všechny je určitým způsobem ovlivňuje, a proto je těžké rozhodnout o hierarchii, významu a příčinné souvislosti jednotlivých změn. Věda si pokládá otázky „co“ a „jak“ definuje přežití jednotlivých druhů hmyzu za nízkých teplot, často teplot hluboko pod bodem mrazu. K zodpovězení takových otázek je nejprve třeba si termín „přežití za nízké teploty“ přesněji vymezit (Obr. 1).



**Obr. 1. Vymezení termálních limitů pro hmyz (ektotermní organismus).** Diagram ukazuje rychlost vybraného životního procesu (příklady: vývoj, pohybová aktivita) v závislosti na tělní teplotě. Pravá strana obrázku ukazuje termální křivky (TPC, thermal performance curves, Sinclair, 2016) a na nich hlavní termální limity používané pro aktivní fenotypy. U jednoho druhu mohou mít různé procesy různá teplotní optima (obvykle kolem 25 °C). Mimo optimum rychlost procesů klesá, až dosáhne nulové hodnoty (na teplotním minimu nebo maximu, které je většinou prakticky neměřitelné, odvoditelné pouze extrapolací). Jako příklad jsou uvedeny: LDT/UDT (lower/upper developmental threshold, vývojový práh; LDT leží obvykle kolem 10 °C) a  $CT_{min}$ / $CT_{max}$  (nízkoteplotní/vysokoteplotní práh pro pohybovou aktivitu neboli práh pro vstup do teplotního kómatu;  $CT_{min}$  se pohybuje obvykle okolo 5 °C). Celkový rozsah teplot mezi  $CT_{min}$  a  $CT_{max}$  se považuje za rozmezí teplotní tolerance druhu, ovšem platné POUZE pro aktivní fenotyp daného druhu. Levá strana obrázku ukazuje hlavní termální limity platné pro tentýž druh, ale po sezónní změně fenotypu a vstupu do dormance. Životní procesy jsou extrémně zpomaleny či zcela zastaveny a limity pro přežití u poloviny populačního vzorku ( $LT_{50}$ ) mohou klesat velmi hluboko pod nulu. Tato teplota se může nacházet kdekoli pod hodnotou  $CT_{min}$  v závislosti na druhu, aklimačním stavu a také na skupenství tělní vody. Další vysvětlivky v textu. Naprosto čistá voda taje při teplotě právě 0 °C a při téže teplotě teoreticky také mrzne. Prakticky ovšem čistá voda v malých objemech mrzne až po poklesu teploty na -39 °C a do té doby zůstává v tzv. podchlazeném (termodynamicky metastabilním) stavu. Biologické roztoky mají teplotu tání (m.p., melting point) posunutou do mírně podnulových hodnot v závislosti na osmolaritě (typicky na -0,56 °C při osmolaritě 300 mOsm) a spontánně mrznou až po dosažení teploty podchlazení (SCP, supercooling point, obvykle kolem -20 °C). Fázová změna kapalné vody na led může ovšem být urychlena inokulací tělních tekutin vnějším ledem (sněhem, námrazou). Krystalky ledu z okolí snadno pronikají přes kutikulu hmyzu nebo tělní otvory a poté tělní tekutiny hmyzu promrzají již za relativně vysoké teploty ( $T_{ino}$ , teplota inokulace).

Ve své disertaci se budu zabývat pouze teplotami pod bodem tání tělních tekutin (m.p.), tedy kryotermií dormantních fenotypů (viz Obr. 1, kryotermie). Ty druhy hmyzu, které obývají temperátní a polární oblasti, samozřejmě musí být evolučně adaptovány k přežití zimního studeného období v kryotermii. Tato evoluční adaptace obvykle zahrnuje komplexní fyziologickou (fenotypickou) sezónní změnu, vstup do dormantního stavu a chladovou aklimaci, a teprve po této změně je aklimovaný jedinec schopen překonat všechny nástrahy zimního období. Po vstupu do dormantního stavu již není cílem organismu aktivně *žít*, tedy udržet a kompenzovat životní funkce za nízkých teplot, nýbrž pouze *přežít*, tedy udržet v životaschopném stavu všechny molekulární, buněčné a tkáňové struktury.

Přežití hmyzu v kryotermii je zajištěno adaptivním komplexem chladové odolnosti (ten bude podrobněji představen v kapitole 2.1.). Ve své disertaci se soustřeďuji pouze na dva komponenty adaptivního komplexu: na nízkomolekulární metabolity a specifické proteiny s kryoprotektivními funkcemi (zkráceně: kryoprotektanty a LEA-like proteiny). Obě skupiny látek podrobněji představím v kapitolách 2.1.5. a 2.1.6. O významu a funkcích kryoprotektantů v chladové odolnosti hmyzu (a také mnoha jiných organismů včetně rostlin a obratlovců), existuje velmi rozsáhlá vědecká literatura. Naproti tomu LEA-like proteiny byly dosud tradičně spojovány s odolností vůči vysychání, a to hlavně u rostlin a různých mikroarthropodů. Případná role LEA-like proteinů v chladové odolnosti byla dosud uvažována převážně hypoteticky.

Klíčovým aspektem mojí disertační práce je právě propojení adaptivního komplexu biochemických změn v odpovědi na nízké teploty a na vysychání. Dostatek vody v kapalném stavu je totiž další nutnou podmínkou pro aktivní život jakéhokoli organismu. Neadaptovaní živočichové nepřežijí vysychání prostředí a nadkritickou ztrátu kapalné vody z těla. Adaptovaní živočichové za stejných podmínek přežívají, často opět po vstupu do dormantního stavu. Přezimování hmyzu v kryotermii přináší, kromě evidentního problému nízkých teplot, také riziko vysychání a ztráty kapalné vody z těla. V průběhu dlouhého zimního období může docházet k vysychání mikrohabitatu, ve kterém hmyz přezimuje. Pohybová aktivita přezimujícího hmyzu je obvykle nízká (nebo žádná), což omezuje jeho schopnost vyhledávat zdroje kapalné vody. Přítomnost ledu (sněhu, námrazy) v těsném okolí přezimujícího hmyzu může „odsávat“ vodu z jeho těla na fyzikálním principu evaporace a následném připojení vodní páry přímo ke krystalkům ledu, způsobené rozdílem parciálních tlaků vodní páry nad ledem v okolí a nad kapalnou vodou v těle. Ale především, okolní led může proniknout do těla hmyzu, inokulovat jeho tělní tekutiny a způsobit jejich promrznutí – tedy ztrátu kapalné vody její fázovou přeměnou na pevný led (tento jev bude podrobněji popsán v kapitole 2.2).

Ve své disertační práci hledám odpověď na otázku: Do jaké míry jsou sezónní akumulace kryoprotektantů a exprese LEA-like proteinů propojeny v teoretickém adaptivním komplexu (cross-tolerance, kapitola 2.2.), který by mohl zajišťovat jak toleranci evaporační dehydratace, tak také toleranci ztrát kapalné vody po promrznutí. Tuto otázku řeším na modelovém druhu octomilky s holarktickým rozšířením ve studeném temperátním a sub-polárním pásmu,

*Chymomyza costata*, kterou podrobněji představím v kapitole 2.3. Přezimující larvy *C. costata* jsou jedním z nejlépe prostudovaných modelů hmyzí chladové odolnosti a naopak, o jejich případné schopnosti přežít vysychání dosud nebyly prakticky žádné znalosti.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Adaptivní komplex chladové odolnosti hmyzu

#### 2.1.1. Vstup do dormantního stavu

Životní cykly temperátních a polárních druhů hmyzu jsou komplexně přizpůsobeny cyklickým sezónním změnám. Aktivní (letní) fenotypy se pravidelně střídají s dormantními (zimními) fenotypy (Obr. 1). Zimní dormance hmyzu může mít formu buď relativně jednoduché kviescence nebo, častěji, formu komplexní a centrálně regulované diapauzy (Lees, 1955; Danks, 1987; Košťál, 2006). Kviescence je okamžitá a přímá reakce organismu, v jakékoli fázi jeho ontogeneze, na pokles nějakého environmentálního faktoru do podlimitních hodnot (např. pokles teploty, nedostatek vody, absence potravy). Po návratu faktoru do normálu se organismus ihned vrací k aktivnímu životu. Kviescence tedy nevyžaduje žádnou percepci signálů z prostředí, jejich neuronální zpracování ani centrální regulaci.

Diapauza je naproti tomu stav centrálně regulovaný, který může nastat jen v určité, druhově specifické fázi ontogeneze. Hmyz se cíleně připravuje na nepříznivou sezónu již v době, kdy jsou podmínky pro jeho vývoj a aktivitu stále příznivé (teploty jsou v rozmezí optima, je dostatek potravy). Nicméně s přicházejícími signály z okolí (především zkrácování délky dne koncem léta a na podzim) je schopen nepříznivou zimní sezónu předvídat. Děje se tak prostřednictvím fotoperiodických receptorů uložených v mozku a/nebo ve složených očích (Numata a kol., 1997). Krátkodenní signál zapříčiní změnu syntézy a sekrece dvou hlavních vývojových hmyzích hormonů – juvenilního hormonu (JH) a ekdysonu (Walker a Denlinger, 1980; Denlinger, 2002). Různé druhy hmyzu podstupují diapauzu v různých fázích ontogeneze a podle toho se příslušně snižuje buď koncentrace JH (u dospělců) nebo ekdysonu (u larev či kukel) a zastavuje se vývoj (reprodukce u dospělců nebo vývoj primordiálních imaginálních struktur nedospělých larev či kukel). Centrální změna v hormonálním prostředí způsobí hluboké změny v transkriptomu jednotlivých periferních orgánů, následované změnami v proteómu i metabolómu (Emerson a kol., 2010; Kankare a kol., 2010; MacRae, 2010; Ragland a kol., 2010; Poelchau a kol., 2013; Poupardin a kol., 2015; Yocum a kol., 2015; Košťál a kol., 2017).

Hmyz je v raných fázích diapauzy často stále ještě pohybově aktivní, s poměrně vysokou intenzitou metabolismu. Tato aktivita slouží pro intenzivní příjem potravy a následnou akumulaci energetických rezerv (Hahn a Denlinger 2007), dále pro nalezení vhodného mikrohabitu k přezimování (včetně dálkových migrací), nebo pro vytváření ochranných struktur, ať už jde např. o tvorbu kokonu (Danks, 1987), či o zpevnění kutikuly (Benoit,

2010), a dále k aktivizaci ochranných mechanismů jako je tvorba šokových proteinů (Rinehart a kol., 2001) či stimulace antioxidantního systému (Jovanović-Galović a kol., 2007). V pozdější fázi diapauzy pohybová aktivita ustává, výrazně se snižuje rychlost metabolismu (a to i za relativně vysokých teplot) a nastává vlastní dormantní fáze, ve které hmyz setrvává až do příchodu jara.

Z hlediska mé disertace je důležitý ten fakt, že vstup do diapauzy je pro hmyz podstatnou podmínkou pro to, aby byl schopen úspěšně projít další fází sezónní fenotypické proměny – chladovou aklimací, která je už spojena s vlastním podzimním a zimním poklesem teplot v prostředí (Denlinger, 1991). V průběhu chladové aklimace se dále zvyšuje chladová odolnost jedince, až dosahuje svého maxima – limitů  $LT_{50}$  (viz. Obr. 1). Zvýšení chladové odolnosti na sezónní maximum je podmíněno adaptivním komplexem změn, z nichž ty nejvýznamnější nebo nejčastěji pozorované rozeberu v následujícím textu. Soustředím se zejména na akumulaci nízkomolekulárních a vysokomolekulárních látek s kryo-protektivními, nebo obecně cyto-protektivními, účinky. Mechanismy působení jednotlivých typů látek v hmyzím organismu jsou teoreticky velmi rozmanité: silně závislé na typu látky, na její koncentraci, na stavu (skupenství, fázi) tělních tekutin (podchlazení nebo přechod do krystalické fáze nebo přechod do amorfni pevné fáze), a zejména na teplotě. Experimentální funkční analýzy kryoprotektivních mechanismů jsou v literatuře poměrně vzácné. Většina dosud publikovaných prací spoléhá na korelativní analýzu (vyšší koncentrace určité látky koreluje s vyšším přežitím za nízkých teplot) a vysvětluje působení látek na hmyzí organismus pouze hypoteticky nebo spekulativně.

### 2.1.2. Fázové stavy vody

Fyzikální vlastnosti tělní vody mají zásadní vliv na všechny životní procesy hmyzu. Při poklesu teploty tělní vody pod bod tání (m.p., viz Obr. 1) využívá hmyz následujících strategií: **(1)** snaží se udržet tělní vodu v tekutém, podchlazeném stavu (supercooling), tzn. snaží se vyhnout promrznutí tělní vody (freeze-avoidance); **(2)** snaží se řízeně promrznout a poté tolerovat přítomnost ledu ve svém těle (freeze-tolerance); **(3)** prochází tzv. kryoprotektivní dehydratací, při které voda sublimuje mimo tělo, kde se připojí k okolním krystalkům ledu (cryoprotective dehydration) (Zachariassen, 1985; Holmstrup a Westh, 1994; Holmstrup a kol., 2002; Renault a kol., 2002; Sinclair a kol., 2003; Sinclair a Renault, 2010). Navíc, velmi malé objemy kapalné, ale „vázané“ tělní vody (bound water) v silně zahuštěných roztocích po ztrátě většiny „volné“ vody (bulk water) promrznutím nebo dehydratací, mohou přejít do pevné, amorfni fáze vody (zasklení vody, vitrifikace) (Sformo a kol., 2010; Košťál a kol., 2011b). Podrobněji představím pouze fázové stavy podchlazení a promrznutí.

*Podchlazení:* Ty druhy hmyzu, pro které by promrznutí tělní vody bylo letální, spoléhají na přirozenou fyzikální schopnost podchlazování vody. To znamená, že musí z těla odstranit tzv. nukleátory ledu (IN – ice nucleators). Jejich přítomnost by vedla ke vzniku zárodečného krystalu ledu, následně k jeho rychlému růstu, promrznutí volné tělní vody a

smrti. Povaha IN není dobře známa. Jedná se pravděpodobně o zbytky potravy ve střevě, zejména bakteriálního původu (Rozsypal, 2015). V hemolymfě hmyzu jsou rozpuštěny látky (ionty, metabolity, makromolekuly), které snižují teplotu bodu tání, a rovněž teplotu podchlazení, na tzv. koligativním principu [zvýšení osmolarity vodného roztoku o 1 Osm vede k poklesu bodu tání o kryoskopickou konstantu vody  $-1,86\text{ }^{\circ}\text{C}$  a k poklesu bodu podchlazení o přibližně 2 až 4  $^{\circ}\text{C}$  (Zachariassen, 1985)]. Sezónní akumulace kryoprotektivních látek (někdy spojená s částečnou ztrátou tělní vody) tak může vést k velmi silnému poklesu bodu podchlazení až k teoretickému limitu pro čistou vodu ( $-39\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) nebo dokonce i níže (Angell, 1982). Strategii podchlazování pravděpodobně využívá většina druhů hmyzu mírného podnebného pásma, zejména na severní polokouli (Salt, 1961; Sinclair a kol., 2003).

*Promrznutí:* Vydáme-li se dále směrem k pólům, začne relativně přibývat druhů, které tolerují promrznutí tělní vody. Jejich strategie je zcela opačná než u druhů podchlazujících. Snaží se o promrznutí tělní vody v extracelulárních prostorech (v hemolymfě) již za relativně vysoké teploty (tedy mírně pod bodem mrazu; tedy proti přirozené tendenci vody k podchlazování). Toho je dosaženo buď inokulací hemolymfy okolním ledem ( $T_{\text{ino}}$  na Obr. 1) (Rozsypal a Košťál, 2018) nebo sezónní syntézou specifických nukleačních proteinů (PIN, Protein Ice Nucleators) (Lundheim, 2002). Čím výše je totiž položený reálný bod mrznutí (např.  $T_{\text{ino}}$  na Obr. 1 při nukleaci okolním ledem), tím je mrznutí pomalejší, tvoří se menší množství malých krystalků ledu, a dochází tak k postupnému vyrovnávání osmotického tlaku mezi promrzajícím extracelulárním prostorem (hemolymfou) a kapalným intracelulárním prostorem (Block W., 1991) (viz také Obr. 5). Jak postupně přibývá ledu v hemolymfě, ubývá v ní kapalné vody, a hemolymfa se zahušťuje. To má za následek osmotické odsávání vody z cytosolu buněk – právě tato mrazová dehydratace buněk je významným aspektem méj disertační práce (podrobněji viz kapitola 2.2.).

### 2.1.3. Restrukturalizace biologických membrán

Biologické membrány hrají zásadní roli ve fyziologii buňky. Zprostředkovávají regulovaný transport rozpuštěných látek, podílejí se na udržení elektrochemického potenciálu, účastní se energetického metabolismu a poskytují organizovanou matici pro membránové proteiny. Funkčnost biologických membrán je tedy naprosto nezbytná pro přežití organismu. Fyzikálně-chemické vlastnosti biologických membrán, zejména jejich fázový stav a fluidita (uspořádanost lipidické dvojvrstvy), jsou přímo ovlivněny teplotou a hydratací. Podle toho se mohou membránové lipidy nacházet ve třech různých fázových stavech: tekutě-krystalinní fáze ( $L_{\alpha}$ ), funkční fluidní dvojvrstva za optimální teploty a hydratace; gelová fáze ( $L_{\beta}$ ), vysoce uspořádaná lipidová dvojvrstva za nízké teploty; obrácená hexagonální fáze ( $H_{II}$ ), neslučitelná se životaschopností buňky za vysoké teploty nebo nízké hydratace (Chapman, 1975). Díky různorodosti lipidů obsažených v membránách má fázový přechod široké teplotní rozmezí. Proto mohou za určitých nízkých teplot koexistovat například gelová a tekutě-

krystalinní fáze zároveň. Takové místo se nazývá jako oblast fázové separace a dochází zde k výraznému snížení bariérové funkce membrány. Neregulovaný vznik gelové či hexagonální fáze tedy přímo ohrožuje životaschopnost buňky. Obecně platí, že se sníženou teplotou postupně klesá fluidita membrány (zvyšuje se její uspořádanost) a tím postupně klesá i funkčnost membrány (propustnost, aktivita membránově vázaných enzymů, receptorů, kanálů a iontových pump apod.) (Cossins a Macdonald, 1989; Hazel, 1989) až po dosažení určité prahové teploty (dané právě složením membrány) dojde k přechodu do gelové fáze. Pravděpodobnost přechodu do hexagonální fáze naopak stoupá s rostoucí teplotou a rovněž s klesající hydratací.

Vstup do diapauzy a chladová aklimace jsou spojeny s restrukturalizací lipidického složení biologických membrán u různých poikilotermních organismů od bakterií (Sinenski, 1974; Tasaka a kol., 1996; Allakhverdiev a kol., 1999), protozoí (Nozawa a kol., 1974) a kvasinek (Suutari a kol., 1997), přes rostliny (Murata a Yamaya, 1984; Miquel a kol., 1994), až po různé živočichy jako jsou hlístice (Murray a kol., 2007), ektotermní obratlovci (Hazel, 1989; Cossins, 1994; Cossins, 1998) a hmyz (Hodková a kol., 2002; Tomčala a kol., 2006; Overgaard a kol., 2008; Pruitt a Lu, 2008; Kostal, 2010;).

U všech organismů se dají pozorovat ve složení buněčných membrán následující změny: (i) desaturace řetězců mastných kyselin (MK); (ii) zkracování průměrné délky řetězců MK; a (iii) zvýšení relativního podílu fosfoetanolaminů na úkor fosfocholinů. Tyto strukturální změny ve složení membrán mění jejich fyzikálně-chemické vlastnosti a přispívají tak k udržení funkčnosti za nízkých teplot a strukturální integrity v silně podchlazeném nebo zmrzlém stavu (McElhaney, 1984; Hazel, 1995). Nejčastěji pozorovaným jevem při restrukturalizaci membrán je desaturace řetězců MK. Přidáním cis-dvojně vazby vznikne „zalomení“ řetězce MK, jež udělí molekule fosfolipidu kónický tvar, který snižuje uspořádanost (zvyšuje fluiditu) fosfolipidové dvojvrstvy. Tím se rovněž sníží teplotní práh pro přechod do gelové fáze (Li a kol., 1998; Wang a kol., 1999). Zkrácení průměrné délky řetězců MK zmenšuje oblast hydrofobních interakcí mezi řetězci MK, což má podobné důsledky na fluiditu a teplotu přechodu do gelové fáze jako desaturace MK. (Hazel, 1997). Fosfoetanolaminová skupina je menší a méně hydratovaná než skupina fosfocholinová. Proto mají opět molekuly fosfolipidů obsahující etanolamin více kónický tvar, který se hůře uspořádává do struktury membrány, a tím podporuje její fluiditu a snižuje teplotu přechodu do gelové fáze (Hazel, 1989).

#### 2.1.4. Oxidativní stres

Oxidativní stres je patrně jednou z důležitých forem poškození u hmyzu v souvislosti s chladovým nebo mrazovým stresem. Ovšem detailní funkční analýzy nejsou dosud k dispozici. V průběhu poklesu teploty se mění fyzikálně-chemické vlastnosti vnitřní mitochondriální membrány (viz kapitola 2.1.3.), kde probíhá oxidativní fosforylace. V důsledku toho může docházet ke zvýšené produkci kyslíkových radikálů a oxidativnímu



stresu. Naopak, po zvýšení teploty, jež následuje po chladné periodě, dochází k prudkému nárůstu rychlosti metabolismu, zrychlení oxidativní fosforylace, a tedy opět k vyšší pravděpodobnosti tvorby volných kyslíkových radikálů. U několika druhů hmyzu bylo pozorováno, že jsou adaptivně regulovány různé enzymatické i ne-enzymatické systémy pro ochranu před kyslíkovými radikály v přípravě na potenciální chladový stres (buď během vstupu do diapauzy, nebo během chladové aklimatizace) (Rojas a Leopold, 1996; Lalouette a kol., 2011; Torson a kol., 2015).

#### 2.1.5. Nízkomolekulární kryoprotektivní látky

Různé organismy mohou v reakci na environmentální stres akumulovat malé ochranné molekuly (Yancey, 2005). Tyto molekuly se obvykle nazývají kompatibilní osmolyty, protože byly poprvé popsány u organismů, které se musí vyrovnávat s osmotickým stresem. Později však byly podobné látky pozorovány u většiny forem života a bylo zjištěno, že mají celou řadu ochranných funkcí (Yancey a Siebenaller, 2015). Akumulace malých molekul je také jedním z charakteristických znaků adaptace hmyzu na chlad, potom tyto molekuly můžeme souhrnně označit jako nízkomolekulární kryoprotektanty (Salt, 1961; Sømme, 1982; Zachariassen, 1985; Lee, 2010a). Hmyzí kryoprotektanty mají nejčastěji povahu cukrů, polyolů (Storey a Storey, 1988; Storey a Storey, 1991) a volných aminokyselin (Košťál a kol., 2011b). Obecně mohou kryoprotektanty působit jedním ze tří základních mechanismů: (i) prostřednictvím ovlivnění fázového chování vody (stabilizace podchlazení, oddálení mrznutí, stimulace skelného přechodu, apod.); (ii) prostřednictvím ochrany před toxickými zplodinami metabolismu (antioxidace, udržování redoxní rovnováhy, detoxifikace); a (iii) prostřednictvím stabilizace funkční struktury makromolekul, která je založena na specifických termodynamických interakcích mezi rozpouštědlem (vodou), kryoprotektanty rozpuštěnými v biologickém roztoku a vlastní chráněnou strukturou makromolekuly (protein, nukleová kyselina, lipidová dvojvrstva).

*Ad (i):* Relativně vysoké koncentrace nahromaděných kryoprotektantů významně snižují bod tání biologických roztoků na koligativním principu, tedy v přímé závislosti na osmolaritě roztoku (kryoskopická konstanta vody je  $-1,86^{\circ}\text{C}$ ). Zároveň se snižuje i bod podchlazení o přibližně 2–4  $^{\circ}\text{C}$  na každý Osm zvýšené koncentrace roztoku (Zachariassen, 1985). Se zvyšováním koncentrace roztoku zároveň roste jeho hustota, snižuje se mobilita molekul vody a tím i jejich schopnost připojovat se k rostoucímu zárodečnému krystalku ledu. Tímto způsobem se stabilizuje metastabilní podchlazená fáze vody a podchlazený hmyz se tak může vyhnout letálnímu promrznutí. Koncentrace nahromaděných kryoprotektantů může dosáhnout až neuvěřitelných hodnot: 3M etylenglykolu u lýkožrouta *Ips acuminatus*, (Gehrken, 1984) nebo 5M glycerolu u vosičky *Bracon cephi* (Salt, 1961). Takto vysoké koncentrace činí biologický roztok prakticky nemrznoucím.

U promrzajících druhů hmyzu by akumulace příliš vysokých koncentrací kryoprotektantů byla kontraproduktivní, protože tento hmyz preferuje zmrznutí při relativně vysokých teplotách. Nicméně, bylo zjištěno, že i promrzající hmyz akumuluje relativně nízké až střední koncentrace různých kryoprotektantů (Storey a Storey, 1988). V tomto případě je obecnou funkcí nahromaděných kryoprotektantů snížit množství ledu vznikajícího při dané teplotě pod bodem mrazu a tím snížit osmotické odsávání vody z buněk, tj. omezit dehydrataci a smršťování buněk (Meryman, 1971; Storey a Storey, 1988; Rozsypal a Košťál, 2018; Rozsypal a kol., 2018). U hmyzu, který prošel mrazovou dehydratací, může navíc zbývající voda s rozpuštěnými kryoprotektanty přecházet do amorfni skelné fáze (Rudolph a Crowe, 1986). Nejméně u dvou druhů hmyzu bylo prokázáno, že k tomu skutečně přirozeně dochází, a navíc, že přechod do skelné fáze může být adaptivní a napomáhá k přežití za extrémně nízkých teplot (Sformo a kol., 2010; Košťál a kol., 2011b; Rozsypal a kol., 2018).

*Ad (ii):* Mnoho kryoprotektantů má antioxidační potenciál, například trehalóza (Reyes-DelaTorre a kol., 2012), prolin (Kaul a kol., 2008) nebo glutamin (Arakawa a Timasheff, 1985). Tyto látky tedy mohou, alespoň teoreticky, chránit přezimující hmyz před oxidativním poškozením. Biosyntéza polyolů z cukerných prekurzorů spotřebovává redukční sílu ve formě NADPH. Vzhledem k tomu, že NADPH je také potřebný pro zpětnou redukci oxidovaného glutathionu, může mít navíc metabolismus polyolů vliv na celkovou redoxní rovnováhu v biologických roztocích. Mrazová dehydratace buněčných roztoků u promrzajících druhů hmyzu vede ke zvýšení koncentrací potenciálně toxických látek v cytosolu, jako jsou anorganické kationty ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ), protony ( $H^+$ ), nebo dusíkaté látky jako močovina, arginin a lysin. Všechny tyto látky, pokud se vyskytují ve vysokých koncentracích, mají nepříznivý vliv na funkční strukturu proteinů a působí jako denaturanty jejich nativní konformace (Timasheff, 1993). Nahromaděné kryoprotektanty mohou patrně tento nepříznivý vliv kompenzovat (Somero, 1986; Yancey, 2005).

*Ad (iii):* Stabilitu makromolekul a integritu makromolekulárních komplexů přímo ohrožuje jak nízká teplota, tak nízká aktivita vody. U podchlazujících druhů hmyzu dominuje vliv nízkých teplot, zatímco v případě promrzajících druhů hmyzu oba nepříznivé faktory spolupůsobí. Prvním krokem k denuraci proteinů je obvykle rozpad jejich polymerní struktury. Řada polymerních proteinů ve vodném roztoku depolymerizuje již při teplotách těsně nad bodem mrazu, nebo nad bodem tání roztoku (Privalov, 1990). Depolymerizované proteiny ztrácejí svou aktivitu (enzymatická aktivita, signalizace) nebo strukturní funkci (cytoskelet, myofibrily). Avšak depolymerizace je po návratu do optimální teploty obvykle reverzibilní, a proto nemusí negativně ovlivnit životaschopnost hmyzu stresovaného pouze mírným chladem a po krátkou dobu. Otázkou zůstává, nakolik je re-polymerizace možná po dlouhodobém vystavení hlubšímu chladovému stresu, jako je podchlazení nebo dokonce mrazová dehydratace buněk u přezimujícího hmyzu (Des Marteaux a kol., 2018b).

V podchlazeném roztoku může dojít, alespoň v teoretické rovině, ke skutečné denaturaci proteinů (tj. k linearizaci řetězců a obnažení jejich vnitřních hydrofobních domén) přímým působením velmi nízkých teplot. Uvažuje se, že tzv. chladová denaturace proteinů za teplot pod  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  je principiálně podobná a stejně pravděpodobná jako typická denaturace teplem, obvykle za teplot nad  $40\text{-}50\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Dias a kol., 2010; Sanfelice a Temussi, 2016). Denaturované proteiny mohou snadno agregovat (tj. těsně interagovat prostřednictvím obnažených hydrofobních oblastí). Agregace je obtížně reverzibilní, a proto může negativně ovlivnit životaschopnost hmyzu po silném chladovém stresu. Fosfolipidové dvojvrstvy mohou za nízkých teplot podléhat fázovému přechodu do nefunkční gelové fáze. Téměř všechny typy akumulovaných kryoprotektantů (cukry, polyoly, aminokyseliny) mohou u podchlazeného hmyzu chránit nativní proteinové struktury, a také funkční fázi tekuté-kryštalinní dvojvrstvy, mechanismem známým jako preferenční exkluze (Arakawa a Timasheff, 1985; Timasheff, 1992a). Téměř všechny kryoprotektanty se ve vodných roztocích chovají jako kosmotropy, tj. látky snadno rozpustné ve vodě, preferující interakce s molekulami vody před interakcemi s proteiny nebo fosfolipidovými skupinami. V důsledku toho jsou kosmotropní kryoprotektanty přednostně vytlačovány (preferential exclusion) z okolí makromolekul, čímž jsou naopak makromolekuly přednostně hydratované, a tak termodynamicky stabilnější (Xie a Timasheff, 1997; Timasheff, 1998; Jensen a kol., 2004; Ball, 2008).

Buňky promrzajícího hmyzu jsou vystaveny nízkým teplotám v kombinaci se dvěma dalšími silnými stresory: nedostatek kapalně vody (mrazová dehydratace) a přítomnost ledových krystalků (mechanický stress). K dalším negativním projevům dehydratace buněk mrazem patří rostoucí koncentrace toxických látek (viz. výše) a přehustění cytoplazmatických organel, jejich těsný kontakt až případně fúze jejich membrán (Uemura a kol., 1996). Proto je stres způsobený mrazem ve srovnání s pouhým podchlazením na stejnou teplotu mnohem rizikovější (Carpenter a Crowe, 1988; Franks a Hatley, 1991; Muldrew a kol., 2004). Stresující faktory spojené s mrazovou dehydratací buněk ovlivňují současně čtyři úrovně biologické organizace.

(i): Na molekulární úrovni způsobují snížení kinetické energie a reaktivity všech molekul, ale zejména závažně ohrožují funkční konformace makromolekul, stabilitu a integritu jejich komplexů. Proteiny denaturují a mohou následně vytvářet nerozpustné agregáty. Membrány mohou přecházet lokálně jak do gelové fáze (kvůli nízkým teplotám) tak i do hexagonální fáze (kvůli nízké aktivitě vody). Při nízké aktivitě vody mohou nukleové kyseliny měnit konformaci z biologicky relevantní formy B na nefunkční formu A (Brovchenko a Oleinikova, 2008) a exponované smyčky euchromatinové DNA se mohou při mechanickém namáhání fyzicky zlomit (Lubawy a kol., 2019).

(ii): Narušení molekulární aktivity přímo ovlivňuje úroveň metabolismu. Biochemické a buněčné procesy jsou silně inhibovány. Navíc, led je účinnou bariérou pro pronikání kyslíku do tkání a buňky jsou tak vystaveny anaerobním podmínkám. Neuspořádané metabolické přeměny mohou způsobit postupné vyčerpání energie a/nebo nahromadění toxických

meziproductů (Storey a Storey, 1985; Joannis a Storey, 1996). (iii): Osmotické fluktuace (voda z buňky ven při extracelulárním mraznutí /zpět do buňky dovnitř při tání) a rostoucí ledové krystaly působí na jemnou organizaci cytoplazmy, na struktury buněčných organel i na uspořádanou extracelulární matrix. Dochází k delokalizacím organel a případně i k jejich mechanické destrukci – buňky a tkáně tak mohou ztratit svou fyzickou integritu (Lovelock, 1954; Mazur, 1984).

(iv): Na úrovni systému mohou poškozené molekuly, organely a buňky selhávat při obnovení orgánových životních funkcí po mrazovém stresu, což může způsobit kolaps celého organismu nebo přinejmenším ztrátu jeho fitness (Pörtner, 2002; MacMillan, 2019).

Předpokládá se, že vysoké koncentrace specifických kryoprotektantů chrání nativní proteinové struktury před denaturací a agregací vyvolanou mrazovou dehydratací (Inoue a Timasheff, 1972; Tamiya a kol., 1985; Franks a Hatley, 1991; Wang, 1999; Bolen a Baskakov, 2001; Kaushik a Bhat, 2003; Toxopeus a Sinclair, 2018). Protože během mrazové dehydratace buněk dochází ke ztrátě kapalné vody, mechanismus preferenční exkluze (viz. výše) nefunguje. Většina kosmotropních kryoprotektantů, které dobře chrání proteiny ve vodném roztoku, není schopna ochránit proteiny nebo fosfolipidové dvojvrstvy při poklesu hydratace pod 0,3 g vody na gram suché hmoty (Hoekstra a kol., 2001a) (obvyklá hydratace hmyzího organismu se pohybuje mezi 2 až 4 g vody na gram suché hmoty). Některé kryoprotektanty však vykazují specifické vlastnosti, které mohou vysvětlovat jejich empiricky pozorované kryoprotektivní schopnosti za nízké aktivity vody. Například prolin a arginin jsou mezi všemi aminokyselinami velmi specifické svou schopností přímo interagovat s částečně denaturovanými proteiny (např. v důsledku mrazového stresu) a stabilizovat je v přechodné fázi tzv. *molten globule*, přičemž zabraňují jejich další denaturaci a agregaci (Samuel a kol., 1997; Das a kol., 2007; Lange a Rudolph, 2009; Schneider a kol., 2011). Prolin a arginin při vysokých koncentracích a nízké aktivitě vody vykazují vysokou tendenci k samo-uspořádání a tvorbě supramolekulárních klastrů (stacked columns) kdy jejich hydrofóbní domény navzájem interagují (pyrolidinové kruhy prolinu, metylové skupiny argininu) a vytváří tak hydrofóbní povrch, který může interagovat s obnaženými hydrofóbními doménami částečně denaturovaných proteinů (Rudolph a Crowe, 1986; Das a kol., 2007). Dále, trehalóza a některé další di- a tri-sacharidy mají pozoruhodnou schopnost stabilizovat membrány při vysychání (Crowe a kol., 1984; Thompson, 2003). Mohou vytvářet vodíkové můstky s polárními fosfátovými zbytky na fosfolipidových skupinách, a tím nahrazovat chybějící molekuly vody a stabilizovat membránu při nedostatku vody. Proto je tento mechanismus znám jako substituce vody (water replacement) (Crowe a kol., 2001; Crowe, 2007).

Trehalóza má navíc silnou schopnost stimulovat přechod vysoce koncentrovaných tělních roztoků do amorfni fáze „skla“ (Chen a kol., 2000; Cesaro a kol., 2008). V průběhu skelného přechodu se viskozita podchlazené kapaliny rychle zvyšuje s tím, jak se zvyšuje četnost a síla vodíkových vazeb. Ve zředěném roztoku se většina vodíkových vazeb vytváří mezi molekulami vody, ale s rostoucí koncentrací solutu dochází k častějším interakcím mezi

vodou-trehalózou a trehalózou-trehalózou, až do bodu, kdy molekuly trehalózy vytvoří velké klastry, které vylučují vazbu s vodou (Olgenblum a kol., 2020). Zvýšením viskozity se zpomalí molekulární dynamika a makromolekuly jsou „uvězněny“ v amorfní matici, což pravděpodobně brání nežádoucím přechodům, jako je například rozvolnění a denaturace struktury proteinů. Trehalóza navíc může přímo vytvářet vodíkové vazby s makromolekulami, což pravděpodobně dále zvyšuje jejich stabilitu v amorfním stavu (Crowe a kol., 1998; Olgenblum a kol., 2020).

Schopnost stimulovat přechod do skelné fáze byla dříve některými autory připisována také prolinu (Rudolph a Crowe, 1986). Pozdější měření však ukázala, že prolin tuto schopnost nemá, a to ani v koncentracích kolem 1M (Rasmussen a kol., 1997; Liu a kol., 2020; Moos a kol., 2022). Fyzikální chemie však odhalila jinou specifickou vlastnost prolinu – jeho mimořádně vysokou rozpuštnost ve vodě, která dosahuje hodnot až 15 molů prolinu na kilogram vody – tedy 1 725 g prolinu na kg vody (Qiu a kol., 2019). Ve vysokých koncentracích tvoří prolin četné hydrofilní interakce (vodíkové můstky) s molekulami vody a vytváří tak hustou, tzv. viskoelastickou kapalinu (de Molina a kol., 2017). Tato kapalina zůstává v kapalně fázi i za teplot velmi hluboko pod nulou a vykazuje termické chování, které je typické pro tzv. NADES systémy (Natural Deep Eutectic Systems; Choi a kol., 2011) – silná suprese m.p. a prakticky absolutní eliminace krystalizace ledu. V současnosti jsou právě NADES systémy uvažovány jako nový nadějný směr vývoje kryoprotektivních směsí pro kryoprezervaci savčích buněk nebo tkání (Hornberger a kol., 2021).

Vysoké koncentrace trehalózy, prolinu a snad i některých proteinů, včetně LEA-like proteinů (viz. kapitola 2.1.6.), mohou sloužit jako jakýsi molekulární štít, který zabraňuje nežádoucím interakcím mezi těsně přiléhajícími fosfolipidovými dvojvrstvami (zabraňují jejich fúzi) nebo mezi proteiny (zabraňují jejich agregaci) (Anchordoguy a kol., 1987; Bryant a kol., 2001; Hoekstra a kol., 2001a; Ball, 2008).

### 2.1.6. Exprese specifických proteinů

V rámci přípravy na zimní období se v těle některých druhů hmyzu specificky hromadí dvě třídy proteinů spojených s regulací tvorby ledových krystalků: anti-freeze proteiny (AFP) a proteinové nukleátory ledu (PIN, Protein Ice Nucleators) (Zachariassen a Kristiansen, 2000; Duman, 2001; Duman a kol., 2010; Duman, 2015). V případě podchlazeného hmyzu se setkáváme s AFP, které se vážou na povrch zárodečného ledového krystalu, brání molekulám vody v navázání se do krystalické mřížky ledu a potlačují (*inhibují*) tak další růst krystalu. Rovnovážný bod mrznutí se takto může snížit oproti rovnovážnému bodu tání o  $-2$  °C až  $-8$  °C (vzniká tzv. teplotní hystereze, jejíž velikost závisí na typu a konkrétním druhu AFP). Termodynamicky nestabilní podchlazená fáze vody se tak dále stabilizuje (viz také kapitola 2.1.5., stabilizace pomocí kryoprotektantů). Paradoxně jsou AFP aktivní i u některých druhů promrzajícího hmyzu, které preferují začít promrzat již při relativně vysokých teplotách. U

tohoto hmyzu AFP obvykle vykazují pouze slabou hysterezi (snižují rovnovážný bod mrznutí pouze o zlomek °C) a plní spíše jinou funkci: zabraňují rekrytalizaci ledu (Capicciotti a kol., 2013). Rekrytalizace je jev, kdy při jemném kolísání podnulové teploty při dlouhodobém zmrznutí dochází k opakovanému tání a opět mrznutí malé části roztoku, a přitom se tvoří stále větší a větší krystaly ledu na úkor menších. Tento jev má negativní důsledky, jelikož velké krystaly ledu více narušují delikátní struktury jemných tkání a extracelulární matrix.

Na rozdíl od AFP, nukleátory PIN *stimulují* krystalizaci ledu při relativně vysokých teplotách, blízko bodu mrazu. PIN jsou vybaveny povrchovými doménami, které katalyzují integraci molekul vody do krystalické mřížky ledu. U promrzajícího hmyzu tak PIN zabraňují nežádoucímu podchlazování vody, a naopak urychlují tvorbu ledu za teplot nehluboko pod bodem tání. Velmi podstatné je to, že PIN se nacházejí v hemolymfě a to znamená, že iniciují tvorbu ledu v extracelulárním prostoru. Tím také předchází eventuálnímu mrznutí uvnitř buněk, které by bylo letální (Zachariassen a Kristiansen, 2000).

Šokové proteiny (HSP, Heat Shock Proteins) jsou evolučně silně konzervované a jsou si tedy strukturně velmi podobné u různých organismů (Plesofsky-Vig, 1996; Kiang a Tsokos, 1998). Prvně bylo pozorováno výrazné zvýšení exprese genů kódujících HSP v reakci na tepelný stres u octomilky *Drosophila melanogaster* (Burdon, 1986). Podobná reakce byla později pozorována po vystavení různých organismů chladu a řadě dalších stresorů fyzikální, chemické i biologické povahy. U *D. melanogaster* a dalšího hmyzu existují dvě hlavní třídy stresem-indukovaných HSP: (i) šokové proteiny o přibližné velikosti 70 kDa; a (ii) tzv. malé šokové proteiny o velikosti těsně nad 20 kDa (např. Hsp22, Hsp23, Hsp26, Hsp27) (Lindquist a Craig, 1988; Korsloot a kol., 2004). Stresem-indukované HSP mohou stabilizovat velké proteinové komplexy, jako je např. cytoskelet (Russotti a kol., 1997; Des Marteaux a kol., 2018a), dále mohou interagovat s hydrofobními doménami částečně denaturovaných nebo chybně složených proteinů, které se mohou vyskytovat ve větším množství právě po silném chladovém stresu nebo po mrazové dehydrataci. Po vazbě na HSP jsou poškozené proteiny buď aktivně poskládány do funkční formy, nebo jsou nasměrovány k degradaci v proteazomech (Parcellier a kol., 2003; Strudwick a Schröder, 2007).

Během časných fází diapauzy, a/nebo během postupné chladové aklimatizace, dochází u podchlazujících i promrzajících druhů hmyzu k regulaci genové exprese inducibilních HSP, většinou ke zvýšení relativní četnosti jejich transkriptů. Má se za to, že tato změna je adaptivní a připravuje organismus na teplotní stres, jehož pravděpodobnost se s nadcházející zimní sezónou zvyšuje (Rinehart a kol., 2006; King a MacRae, 2015; Toxopeus a kol., 2019a). Silné zvýšení genové exprese HSP je však téměř všudypřítomně pozorováno až *následně* po chladovém či mrazovém šoku, tedy po návratu do vyšší nebo optimální teploty. Opět je tato reakce téměř automaticky spojována s adaptivním významem, tedy s reparací chladového či mrazového poškození proteinů (Goto a Kimura, 1998; Sinclair a kol., 2007; Colinet a kol., 2010a). Pozorovaný prudký nárůst hladiny mRNA *hsp70* po šoku vedl četné

autory k adaptivním interpretacím. Přímé funkční analýzy u octomilky *D. melanogaster* a dalšího hmyzu však ukázaly, že výsledky genové expresní analýzy (typicky: analýza relativní četností transkriptů mRNA pomocí RT-qPCR) je třeba interpretovat opatrně, neboť nemusí vždy korelovat s množstvím finálního genového produktu (tj. proteinu) a zejména s jeho aktivitou (Feder a Walser, 2005; Nielsen a kol., 2005; Tollarová a kol., 2005). Nicméně, literatura obsahuje také přímé důkazy svědčící pro alespoň částečnou pozitivní roli HSP při reparaci chladového a mrazového poškození hmyzího organismu. Například Colinet a kol. (2010b) popsali, že vyřazení exprese genů pro malé HSP (*hsp22* a *hsp23*) pomocí RNAi u octomilky, prodlužuje dobu jejího zotavení z chladového kómatu. Dále, Rinehart a kol. (2007) použili RNAi pro snížení exprese genu *hsp70* u masařky *Sarcophaga crassipalpis* a zjistili, že toto vede k částečné ztrátě její chladové odolnosti. K velmi podobným závěrům dospěli rovněž autoři z naší výzkumné skupiny, kteří prokázali, že RNAi proti *hsp70* snižuje přežívání po chladovém stresu (podchlazení) u plošnice *Pyrrhocoris apterus* (Košťál a Tollarová-Borovanská, 2009); a úplná absence genu *hsp70* v genomu octomilky *D. melanogaster* negativně ovlivňuje její přežití po extrémním podchlazení (nikoli však po pouze mírném podchlazení – které ovšem rovněž vyvolává silnou upregulaci exprese genu *hsp70* u kontrolních octomilek) (Štětina a kol., 2015).

### 2.1.7. LEA proteiny

Další rodinou proteinů s potenciálně kryoprotektivními vlastnostmi jsou LEA proteiny. LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteiny byly poprvé identifikovány zhruba před 40 lety u bavlníku a pšenice (Dure a kol., 1981; Galau a kol., 1986). Jak jejich název napovídá, LEA proteiny byly původně nalezeny v semenech rostlin, v pozdních fázích jejich embryogeneze, kdy dochází ke ztrátě vody a vysychání semene – tehdy mohou LEA proteiny tvořit až 4 % všech proteinů semene (Roberts a kol., 1993). Později byly další LEA proteiny popisovány ze semen, pylu i vegetativních částí dalších druhů rostlin (Shih a kol., 2005) a začalo být zřejmé, že jejich výskyt v rostlinách je spojen s tolerancí k vysychání (Welin, a kol., 1994; Hoekstra a kol., 2001b). Tolerance k vysychání je sice velmi typická právě pro rostlinná semena, ale nacházíme ji také u mnoha jiných organismů, což podnítilo pátrání po přítomnosti LEA-like proteinů v jejich genomech (Hand, 2011). Dnes známe LEA-like proteiny u bakterií (Stacy a Aalen, 1998; Dure, 2001; Battista a kol., 2001), sinic (Close a Lammers, 1993), plísni a hub (Sales a kol., 2000; Abba a kol., 2006), a také u několika skupin živočichů, kteří mají společnou schopnost překonávat nepříznivá období v anhydrobióze, tedy ve stavu téměř úplného vyschnutí: hlístice (Solomon a kol., 2000; Browne a kol., 2004), vířníci (Tunnacliffe a kol., 2005; Denekamp, 2010), želvušky (Forster, 2009), embrya žábřonožky slaništní (Sharon a kol., 2009; Menze a kol., 2009) a dokonce zástupci hmyzu, chvostoskoci (Clark a kol., 2007; Bahrndorff a kol., 2009) a larvy pakomárů (Kikawada a kol., 2006). Seznam živočišných LEA-like proteinů v současnosti zahrnuje nejméně 101 struktur u 18 různých živočichů (Janis a kol., 2018).

### 2.1.7.1. Třídění a struktura

U rostlin rozeznáváme nejméně 6 různých skupin LEA proteinů v závislosti na strukturních podobnostech a expresních profilech (Wise and Tunnacliffe, 2004; Tunnacliffe and Wise, 2007). U živočichů nacházíme převážně proteiny ze skupiny LEA3, patrně s jedinou výjimkou, což je žábřonožka slaništní (*Artemia salina*), která má i proteiny ze skupin LEA1 a LEA2 (Janis a kol., 2022). Charakteristickým strukturním znakem naprosté většiny dosud známých LEA-like proteinů je paradoxně *absence* uspořádaných sekundárních a vyšších struktur v hydratovaném stavu. LEA proteiny se řadí mezi tzv. IDP proteiny (Intrinsically Disordered Proteins) (Uversky and Dunker, 2010). LEA proteiny jsou silně hydrofilní a ve vodném roztoku mají tendenci tvořit neuspořádanou strukturu tzv. statistického klubka (náhodné stočené stuhy, random coil). Vzájemná podobnost primárních struktur různých LEA není příliš vysoká (viz níže) což činí potíže při vyhledávání a porovnávání struktur možných LEA-like proteinů v genomech a proteomech různých organismů pomocí klasických nástrojů jako je BLAST (Altschul, 1990). Proto byla vyvinuta specifická výpočetní metoda, tzv. POPP (Protein or Oligopeptide Probability Profile), která porovnává proteiny na základě poměrného aminokyselinového složení řetězců, spíše než na základě pořadí aminokyselin (Wise, 2002). Tato metoda tedy hledá specifické aminokyseliny nebo jejich velmi krátké motivy, které se v řetězci vyskytují s výrazně vyšší (nebo naopak nižší) pravděpodobností než u jiných proteinů.

Například, proteiny skupiny LEA3 jsou charakteristické repeticemi krátké 11-merní sekvence TAQAAKEKAXE. K dalším charakteristickým znakům LEA3 sekvence patří například pravidelné výskyty lysinu (K), alaninu (A), aspartátu (D) nebo glutamátu (E) s periodou 11 a také přítomnost následujících aminokyselinových motivů (Tabulka 1; podle Tunnacliffe and Wise, 2007).

**Tabulka 1: Aminokyselinové motivy (POPP) charakteristické pro LEA3 proteiny.**

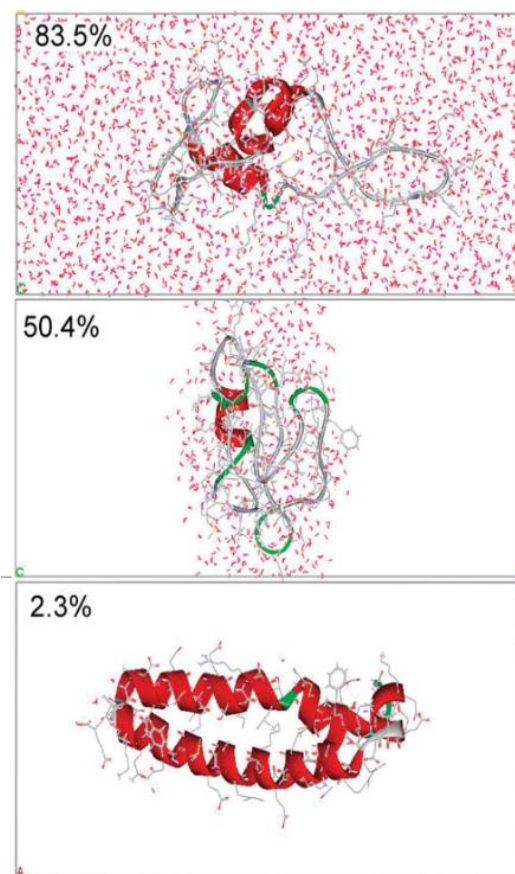
LEA skupina	motiv	Proteinový profil dle POPP
3a	TAQAAKEKAGE	+A, -C, +E, -F, -I, +K, -L, -P, +AE, +AK, +EK, +ET, +GE, +GK, +KE, +AAE, +AKD, +EKA
3b	TAQAAKEKAGE	+A, -I, +K, -L, -P, +Q, +T, -V, +AA, +AQ, +EK, +KE, +KT, +QA, +QQ, +QS, +QT, +TQ, +AAK, +AQA, +EKT, +QAA, +TQQ

+ (respektive -) značí motiv, který je významně častěji (nebo méně často) přítomen v LEA3 sekvenci.

Přestože tedy LEA proteiny mají ve vodném roztoku převážně neuspořádanou strukturu, tak překvapivě mnohé z nich získávají strukturu  $\alpha$ -šroubovice během postupné dehydratace. Tato vlastnost byla původně pozorována u rostlinných LEA proteinů (Wolkers a kol., 2001). Později byla prokázána i u živočišných LEA3 proteinů (Goyal a kol., 2003; Li a He, 2009). Tito autoři pracovali s AavLEA1 proteinem (AAL18843, patří do skupiny LEA3 proteinů)



anhydrobiotické hlístice *Aphelenchus avenae*. Pomocí FTIR spektroskopie a rovněž molekulárním modelováním zjistili, že při postupné dehydrataci (odebíráním molekul vody z modelu) se protein AAL18843 postupně „strukturuje“ (Obr. 2).

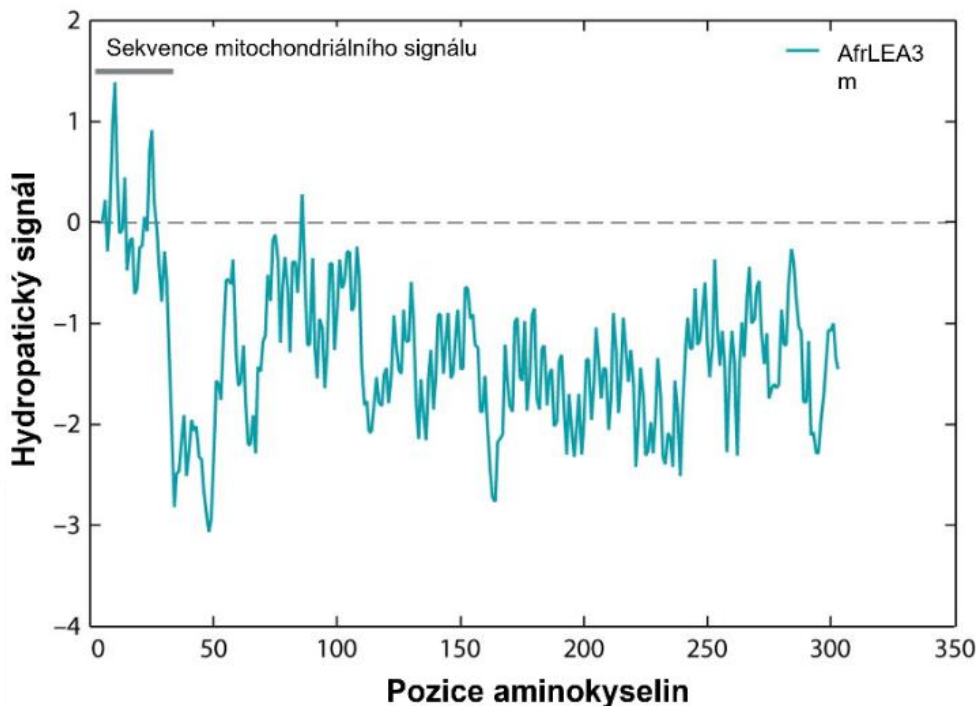


**Obr. 2: Strukturace LEA proteinu v závislosti na množství hydratace ve vodném prostředí.**

Při váhovém podílu vody 83,5 wt % je protein plně hydratován a zaujímá převážně neuspořádanou strukturu (*random coil*). Protein zůstává plně hydratovaný a nestrukturovaný až do poklesu hydratace na ca. 50 wt % (422 molekul vody na jednu molekulu proteinu), ale při dalším úbytku se nedostává molekul vody pro interakce s jeho hydrofilními aminokyselinami, začíná přibývat vodíkových můstků mezi aminokyselinami navzájem, a protein se postupně strukturuje. Při hydrataci 2,4 wt % (10 molekul vody na jednu molekulu proteinu) je převážná část proteinu ve struktuře  $\alpha$ -šroubovice a neliší se od struktury za absence vody. Upraveno podle Li a He (2009).

### 2.1.7.2. Sub-buněčná lokalizace

Seznam živočišných LEA-like proteinů (Janis a kol., 2018) ukazuje, že v genomu jednoho druhu se typicky objevuje více různých LEA3 proteinů. Tato multiplikace naznačuje, že různé varianty mohou mít buď různou funkci nebo různou subbuněčnou lokalizaci. Například u rostlin se různé LEA proteiny nacházejí v cytoplazmě, jádře, mitochondriích, chloroplastech, endoplazmatickém retikulu, vakuolách, peroxizómech i plazmatické membráně (Tunnacliffe and Wise, 2007). Subbuněčná lokalizace LEA3 proteinů živočichů není dosud plně objasněna. Většina z nich patrně lokalizuje do mitochondriální matrix (podobně jako rostlinné LEA3), jelikož mají mitochondriální lokalizační sekvenci na svém N-konci. Například Afr LEA3m (ACM16586) protein žabronožky slaništní má signální peptid o délce 29 aminokyselin, který je relativně hydrofóbní oproti zbytku sekvence, která je celá výrazně hydrofilní (Obr. 3).



**Obr. 3: Hydropatický plot pro protein Afr LEA3m (ACM16586) žábřonožky slaništní.** Skóre pod hodnotou 0 značí hydrofilní aminokyseliny v řetězci proteinu (a naopak). Upraveno podle Menze a kol. (2009).

Po transfekci nukleotidové sekvence pro Afr LEA3m do lidských jaterních buněk byl chimérický protein skutečně transportován a lokalizován do mitochondrií (Menze a kol., 2009). Naopak proteiny ArLEA1A (ABU62809) a ArLEA11B (ABU62810) vířníka *Adineta riciae* vykazují lokalizační a retenční signály pro endoplazmatické retikulum (Pouchkina-Stantcheva a kol., 2007).

### 2.1.7.3. Fyziologické funkce

Přestože jsou LEA proteiny známy už více než 40 let, jejich funkce jsou dosud spíše hypoteticky odvozovány od jejich struktury (převažující hydrofilnost, absence sekundárních struktur za hydratace, strukturace během desikace) a zejména na základě jejich specifického výskytu u anhydrobiotických organismů a zvýšené exprese v reakci na ztrátu vody, popřípadě i na některé další environmentální stresory jako chlad nebo osmotický šok (Welín, a kol., 1994). Uvažuje se o několika možných funkcích (podle Janis a kol., 2018): (i) Molekulární štíty (molecular shields). Tato hypotéza předpokládá, že LEA proteiny fungují jako mechanické (sterické) a elektrostatické bariéry, které brání ostatním proteinům, aby se k sobě po dehydrataci příliš přiblížily a případně agregovaly. Tato hypotéza ovšem vyžaduje, aby byly LEA proteiny akumulovány ve vysokých četnostech (několik molekul LEA by bylo potřeba k účinné izolaci každého jiného proteinu). Rovněž strukturace během dehydratace se zdá být v rozporu z funkcí molekulárního štítu. Hydratované LEA proteiny mají totiž skutečně neobvykle velký hydrodynamický poloměr (velkou aktivní plochu, která může

fungovat jako sterický a elektrostatický štít). S postupnou dehydratací a strukturací se ovšem hydrodynamický poloměr LEA proteinů značně zmenšuje, což má za následek snížení funkčnosti ve smyslu molekulárního štítu. (ii) Hydratační pufrы (hydration buffers). LEA proteiny, díky své převažující hydrofilnosti, mají relativně velké hydratační obaly a díky svým četným interakcím s molekulami vody mohou měnit vlastnosti vodných roztoků. Zejména se uvažuje, že molekuly vody vázané v hydratačním obalu LEA proteinů mohou být uvolněny ve prospěch jiných proteinů při postupující dehydrataci buněčného prostředí (tak, jak se postupně LEA proteiny strukturují a „vzdávají se“ vody). Ani tato hypotéza patrně nepostihuje hlavní funkci LEA proteinů, opět vzhledem k relativně malému množství uvolněné vody i při relativně vysoké expresi LEA proteinů. (iii) Sekvestrace iontů (ion sequestration). Vzrůstající koncentrace anorganických iontů při dehydrataci mohou mít neblahé denaturační účinky na proteiny. Tato hypotéza předpokládá, že přebytečné ionty jsou pufrovány iontovou vazbou na LEA proteiny (respektive na jejich nabitě funkční skupiny). Nabitě funkční skupiny LEA proteinů mohou navíc sloužit jako nukleační jádra pro regulované srážení přebytečných iontů do krystalické struktury. Opět není zřejmé, jak účinná tato funkce může být vzhledem k velmi vysokým koncentracím kovových iontů (zejména  $[K^+]$ ) v buněčných roztocích. (iv) Stabilizace amorfni skelné fáze (reinforcing amorphous glasses). Některé LEA proteiny zvyšují teplotu fázového přechodu ( $T_g$ ) do skelné fáze u roztoků s vysokým obsahem trehalózy nebo jiných cukrů (Wolkers a kol., 2001; Shimizu a kol., 2010). Některé LEA proteiny dokonce stimulují přechod do skelné fáze samy o sobě (tedy bez přítomnosti cukrů v roztoku) (Shimizu a kol., 2010). Čím vyšší je teplota skelného přechodu, tím dříve (za vyšší relativní hydratace) může roztok přejít do amorfni pevné fáze skla, která je považována za silně ochranou jak pro proteiny, tak pro biologické membrány (viz kapitola 2.1.5.). (v) Stabilizace biologických membrán (membrane stabilization). U některých rostlinných LEA proteinů bylo prokázáno, že při desikaci procházejí konformační změnou, pokud jsou v blízkosti umělých fosfocholinových lipozómů (Tolleter a kol., 2010; Bremer a kol., 2017). Tato pozorování naznačila, že LEA proteiny by mohly přímo interagovat také s biologickými membránami a tím je stabilizovat při dehydrataci. U živočišných LEA proteinů není prozatím dostatek informací o jejich možných interakcích s fosfolipidovými membránami. Ale např. Pouchkina-Stantcheva (2007) uvádí, že již výše zmíněný ArLEA11B (ABU62810) vířníka *A. riciae* je atypický tím, že má strukturu  $\alpha$ -šroubovice v hydratovaném stavu, nechrání proteiny (citrát syntáza) při dehydrataci, a naopak, interaguje s fosfolipidovými membránami a snižuje teplotu jejich fázového přechodu do gelové fáze. (vi) Fázová separace (phase separation). Podobně jako dochází ke zvyšování četnosti *intra*-molekulárních interakcí (vodíkových můstků) při postupné dehydrataci LEA proteinu (viz výše), mohlo by docházet také ke zvyšování četnosti *inter*-molekulárních interakcí a tvorbě vyšších oligomerických struktur mezi molekulami LEA (Nakayama a kol., 2007; Rivera-Najera a kol., 2014). Takto by se mohly LEA proteiny vyčleňovat z okolního roztoku (liquid – liquid phase separation, LLPS) do oddělených kapének (membraneless organelles, MLO) se speciálními vlastnostmi roztoku silně odlišnými od vlastností okolí.

Díky interakcím LEA proteinů s dalšími proteiny, popř. molekulami RNA, by také tyto molekuly mohly být „vtahovány“ do vnitřku kapének a vnitřek kapének by poté mohl fungovat jako jejich ochranné prostředí, které může dále expandovat po vtažení dalších a dalších makromolekul (Janis a kol., 2022). Výzkum jevů LLPS a MLO se v současnosti rychle rozvíjí a zdá se, že formování jakýchsi makromolekulárních ochranných kondenzátů (stress granules) by mohlo být dalším mechanistickým vysvětlením ochranné funkce LEA proteinů během dehydratace (Janis a kol., 2018; 2022; Yagi-Utsumi a kol., 2021).

#### 2.1.7.4. Interakce mezi LEA a kryoprotektanty

LEA proteiny a trehalóza mohou mít synergické účinky. Již výše byla zmíněna stabilizace cukerných skel pomocí LEA proteinů. Kromě toho bylo pozorováno, že např. AavLEA1 (AAL18843) protein hlístice *A. avenae* dokáže stabilizovat citrát syntázu při dehydrataci lépe (synergicky) pokud je v roztoku společně s trehalózou, než pokud je v roztoku přítomen sám (Pouchkina-Stantcheva, 2007; Goyal a kol., 2005). Boswell a kol. (2014) studovali synergii trehalózy a dvou proteinů ze skupiny LEA3 u žábřonožky *A. franciscana* (AfrLEA2, ABQ23232; a AfrLEA3m, ACM16586), které porovnávali s kontrolním proteinem (BSA). Tito autoři zjistili, že: (i) LEA3 proteiny mají shodný stabilizační vliv na laktát dehydrogenázu jako BSA, a to v přítomnosti i nepřítomnosti trehalózy; (ii) LEA3 proteiny stabilizují fosfofruktokinázu v přítomnosti trehalózy mnohem lépe než BSA v přítomnosti trehalózy. Data jsou prozatím příliš předběžná a nedovolují generalizaci. Ale existují paralelní informace o tom, že trehalóza synergicky spolupůsobí s malými šokovými proteiny při re-naturaci (skládání, folding) proteinů poškozených tepelným stresem (Singer a Lindquist, 1998; Viner a Clegg, 2001; Ma a kol., 2005).

#### 2.1.7.5. Pravděpodobné funkce LEA při chladovém a mrazovém stresu

Dosud byly funkce LEA proteinů spojovány především s ochranou proti ztrátě kapalné vody při evaporační dehydrataci organismu (viz reference uvedené výše). Jak uvádím v kapitole 2.1.2. (a podrobněji rozvádím v kapitole 2.2.) ztráta kapalné vody hrozí také všem organismům, které tolerují extracelulární promrznutí – tehdy kapalná voda nepřechází do plynné fáze vodní páry (jako u evaporační dehydratace), ale do pevné fáze ledu. Nabízí se tedy hypotéza, že LEA proteiny se mohou uplatnit rovněž při ochraně řízeně promrzajících organismů. Hypotéza byla předběžně testována jak u rostlin, tak u živočichů.

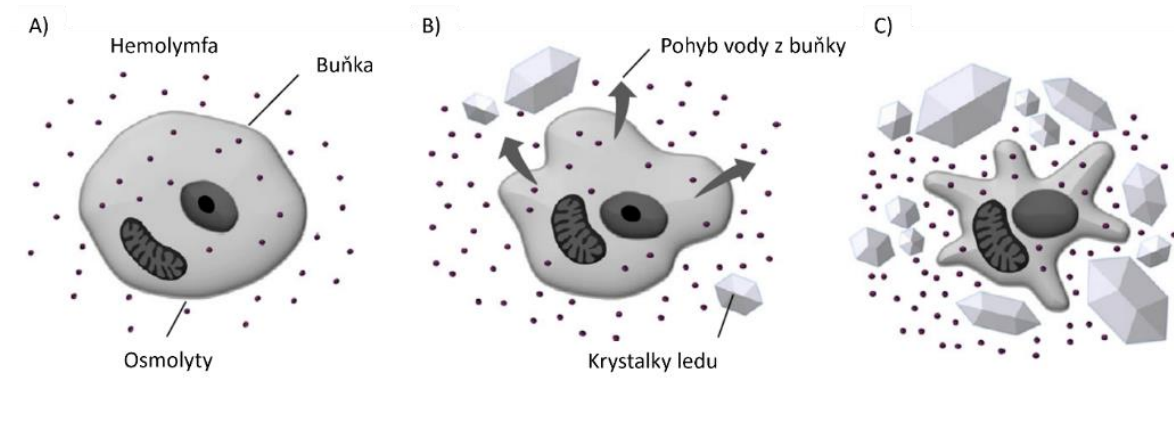
Již koncem předchozího milénia byly publikovány práce, které přinesly genetický důkaz o pozitivním vlivu proteinu COR15a na mrazuvzdornost u rostlin. Podstatné je dodat, že protein COR15a byl později klasifikován jako příslušník skupiny LEA3 proteinů (Wise, 2003). Artus a kol. (1996) připravili transgenní linie huseníčku *Arabidopsis thaliana*, které konstitutivně nad-produkovaly protein COR15a a zjistili, že transgenoze má pozitivní vliv na stabilizaci

chloroplastů huseníčku vystaveného promrznutí. Mechanismus této stabilizace patrně spočívá ve schopnosti COR15a proteinu interagovat specificky s vnitřní membránou chloroplastů a chránit jí před fázovým přechodem do hexagonální fáze při postupující mrazové dehydrataci (Steponkus a kol., 1998). Mnohem později byl podobný mechanismus testován také u živočišných LEA proteinů. Moore a Hand (2016) připravili dva rekombinantní proteiny žábřonožky *A. franciscana* ze skupiny LEA3. Zároveň připravili umělé lipozómy, jejichž fosfolipidové složení odpovídalo vnější (outer mitochondrial membrane – OMM) nebo vnitřní (inner mitochondrial membrane – IMM) mitochondriální membráně embryí žábřonožky. V testech oba rekombinantní proteiny prokázaly jistou schopnost omezit poškození (prosakování, leakage) fosfolipidové dvojvrstvy lipozómů po zmražení na  $-80^{\circ}\text{C}$ . Ochranné vlastnosti se ovšem týkaly pouze OMM a nikoli IMM membrány. Dále bylo zjištěno, že rekombinantní rostlinné i živočišné LEA proteiny mají jistou schopnost chránit strukturu proteinů před denaturací způsobenou mrazovým stresem (Goyal a kol., 2005; Reyes a kol., 2008; Nakayama a kol., 2008). Většina pokusů byla provedena s laktát dehydrogenázou (LDH), která je všeobecně považována za mrazově-labilní enzym, a která byla vystavena mrznutí *in vitro* v roztoku s rekombinantním proteinem, nebo s kontrolním proteinem (BSA, bovine serum albumine). Ochranný vliv rekombinantních LEA proteinů byl sice zřejmý, ale většinou podobný ochrannému vlivu BSA. Tyto výsledky naznačují, že přítomnost *jakéhokoli* proteinu v roztoku může mít ochranný vliv na stabilizaci jiného proteinu. Pokud tedy LEA proteiny mají nějaký specifický stabilizační vliv na proteiny vystavené mrazovému stresu, bude problematické tento vliv experimentálně prokázat *in vivo*, tzn. oddělit jej od nespecifické stabilizace poskytované jinými proteiny v přirozených biologických roztocích, které typicky vykazují velmi vysoké sumární koncentrace proteinů ( $50\text{--}400\text{ mg. mL}^{-1}$ , Chebotareva a kol., 2004). Existuje rovněž alespoň jeden přímý genetický průkaz pro význam živočišných LEA proteinů při ochraně organismu před mrazovým stresem. Toxopeus a kol. (2016) potlačili (pomocí metody RNAi) transkripci genu kódujícího LEA protein (ze skupiny LEA1) u žábřonožky *A. franciscana*. Embrya žábřonožek s potlačenou transkripcí vykazovala nižší přežití po mrazovém stresu než kontrolní skupiny.

Literatura tedy prozatím neobsahuje dostatek důkazů pro funkční význam LEA proteinů při chladovém a mrazovém stresu. Funkční mechanismus působení LEA proteinů v mrazu zůstává nejasný, resp. podobně jako v případě funkčního mechanismu LEA proteinů při dehydratačním stresu (viz výše), zůstává spíše na úrovni hypotéz. Přesto byly již provedeny experimenty ověřující možnost využít LEA proteiny pro kryoprezervaci savčích buněk. Bylo například zjištěno, že rekombinantní LEA protein AvLEA1 hlístice *A. avenae* mírně zlepšuje post-kryoprezervační životaschopnost u lidských mezenchymálních kmenových buněk (Wang a kol., 2020).

## 2.2. Mrazová vs. evaporační dehydratace, cross tolerance

Při postupném promrzání extracelulárního roztoku dochází k tzv. mrazové dehydrataci buněk, resp. jejich cytosolických roztoků. Situace je názorně uvedena na Obrázku 4.



**Obr.4: Model extracelulárního mrznutí.** Led vzniká v extracelulárním prostoru (A), ten se postupně zahušťuje a osmoticky odsává vodu zevnitř buňky (B), až dojde k silné dehydrataci buněčných roztoků a ke smrštění buňky (C). Více informací v textu kap. 2.2. Upraveno podle Toxopeus a Sinclair (2018).

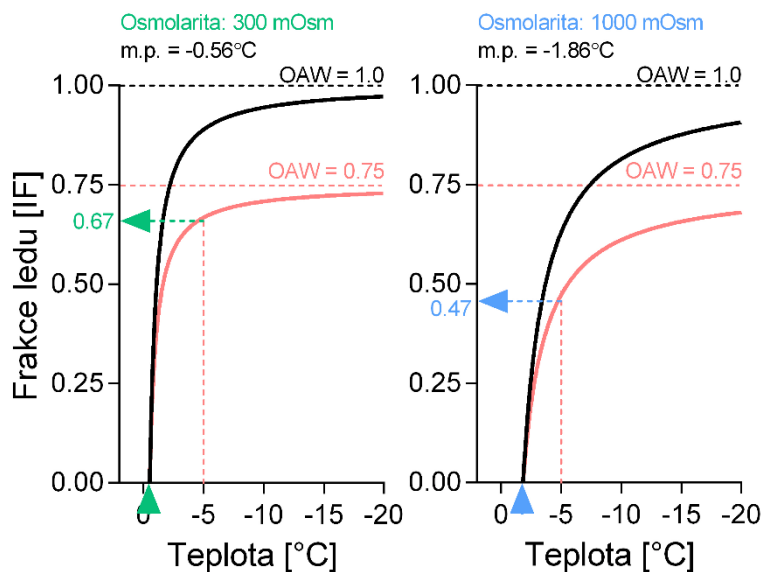
Před začátkem mrznutí (Obr. 4A) jsou extracelulární a cytosolické roztoky živočišných buněk v osmotické rovnováze. Obvyklá osmotická koncentrace u aktivních fenotypů hmyzu se pohybuje okolo hodnoty 300 mOsm (Zachariassen, 1985). Osmotická koncentrace u dormantních, chladově aklimovaných fenotypů hmyzu může ovšem výrazně stoupat, a to díky akumulaci nízkomolekulárních kryoprotektantů, která je někdy doprovázena mírnou desikací. Velmi obvyklý je nárůst osmotické koncentrace o několik desítek až stovek mOsm. V extrémních případech může osmotická koncentrace dosáhnout až několika tisíc mOsm díky akumulaci molárních koncentrací glycerolu (Salt, 1961) nebo etylenglykolu (Gehrken, 1984) (viz kap. 2.1.5.). Mrznutí musí začít v extracelulárním prostoru, za relativně mírných podnulových teplot, což je zajištěno buď inokulací vnějšími ledovými krystalky (Rozsypal a Košťál, 2018) nebo sezónní expresí INA (Zachariassen, 1985; Duman, 2001, Duman a kol., 2010). Jak voda postupně přechází do pevné fáze ledu, extracelulární roztok se zahušťuje, roste jeho osmotická koncentrace, a dochází k osmotickému přesunu vody z cytosolu do extracelulárního roztoku (Obr. 4B). Na Obrázku 4C je pak znázorněna situace, kdy je míra mrazové dehydratace buňky již vysoká, buňka se deformuje a dochází k silnému zahuštění cytosolického roztoku – a tím se tato situace velmi podobá situaci, která nastane po evaporační dehydrataci. Zatímco evaporační dehydratace dokáže odstranit téměř veškerou tělní nebo buněčnou vodu (anhydrobióza), tak mrazová dehydratace má jistý limit daný velikostí frakce „volné“ vody.

Ledové krystalky v extracelulárním roztoku rostou až do momentu, kdy je za dané teploty dosaženo maximální možné frakce ledu, která je dána osmolaritou roztoku, podle jednoduché rovnice (Wang a Weller, 2011):

$$IF = OAW * [1 - (m.p./ T)]$$

**OAW** (osmotically active water) je osmoticky aktivní frakce vody (neboli „volné“, mrznoucí vody) a pohybuje se v rozmezí 0 až 1; **m.p.** je rovnovážný bod mrznutí a tání vodných roztoků daný osmolaritou roztoku podle kryoskopické konstanty vody: 1 Osm = - 1,86°C; a **T** je teplota ve stupních °C.

Frakce osmoticky aktivní (volné) vody se zjišťuje experimentálně (nejčastěji pomocí diferenciální mikro-kalorimetrie). Část molekul vody v biologických roztocích je totiž za fyziologických situací nemrznoucí (osmoticky neaktivní, OIW), protože je nekovalentně „vázána“ v hydratačních obalech makromolekul, metabolitů a iontů. U různých druhů hmyzu, a v různých aklimačních stavech, se podíl OAW frakce pohybuje v rozmezí 60 až 80 % (0,6 až 0,8) (Block, 2013). Rovněž osmolarita roztoku musí být zjištěna experimentálně (nejčastěji pomocí osmometru) a od ní je poté odvozena hodnota m.p. Příklady výsledků rovnice jsou uvedeny na obrázku 5.



**Obr. 5: Porovnání průběhu mrznutí dvou tělních roztoků s rozdílnou osmolaritou (300 a 1000 mOsm).** V obou případech frakce ledu rychle stoupá s klesající teplotou a dosahuje hodnot blízkých svému maximu již za relativně nízkých podnulových teplot. Čím nižší je teplota, tím více ledu se může vytvořit a tím je také míra dehydratace cytosolického roztoku vyšší.

Na každém obrázku můžeme pozorovat dvě situace: (i) černá křivka, OAW = 1, teoretická situace, kdy veškerá tělní voda je „volná“, dostupná pro fázový přechod na led (mrznoucí); (ii) červená křivka, OAW = 0,75, realistická situace, kdy 75% tělní vody je volných a 25% je „vázaných“ (nemrznoucích). Nárůst osmotické koncentrace ze 300 na 1 000 mOsm (typický po sezónní akumulaci kryoprotektantů) způsobí, že za dané teploty (-5°C) se vytvoří v koncentrovanějším roztoku podstatně menší podíl ledu (0,47 v roztoku 1 000 mOsm vs. 0,67 v roztoku 300 mOsm).

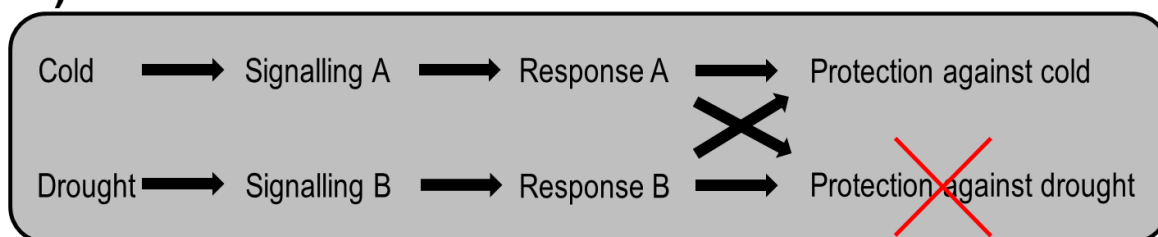
Podobnost evaporační a mrazové dehydratace na buněčné úrovni vedla k opakovaným formulacím hypotézy, že biochemické adaptace na evaporační a mrazovou dehydrataci (tedy obecně na sucho a mráz) mohou být navzájem velmi podobné nebo dokonce shodné (Block, 1996; Danks, 2000). Například Ring a Danks (1994) přímo explicitně hypotetizují, že: „Desikace a kryoprotekce jsou adaptace, které se vzájemně prolínají“ a podporují svou hypotézu několika příklady, kdy tropické druhy hmyzu (diapauzní kukly mūr *Operophtera brumata* a *O. bruceata*, dormantní dospělci brouka *Stenotarsus rotundatus*) akumulují typické kryoprotektanty (glycerol a glukóza), ačkoli nejsou vystaveni nízkým teplotám. Dále si tito autoři všimají, že dormantní temperátní druhy často vykazují alespoň mírnou dehydrataci během své chladové aklimace (ztráta tělní vody v řádu 5 až 40%). Ve své další studii (Ring a Danks, 1998), připisují disacharidu trehalóze hlavní roli společného biochemického markeru obou stresorů (sucho a mráz). Zhruba v téže době hypotetizuje Pullin (1996), že akumulace kryoprotektantů může mít evoluční původ provázaný se vznikem dormance v tropech, která mohla být spojena s mírnou metabolickou akumulací vybraných (netoxických, dobře rozpustných) látek jako jsou jednoduché cukry. Tato reakce mohla být zpočátku selektivně neutrální nebo mohla mít specifický adaptivní význam (energetické zásoby, ochrana proti suchu a proti účinkům evaporativní dehydratace). Po kolonizaci temperátních zón mohla tato reakce nabýt staro-nového adaptivního významu při ochraně proti účinkům chladu a zejména mrazové dehydratace.

Akumulace trehalózy je velmi často pozorována u různých organismů vystavených suchu, zejména u anhydrobiontů (Crowe a kol., 1992; Tapia a Koshland, 2014), ale také u podchlazujících i promrzajících druhů hmyzu (Storey a Storey, 2013; Toxopeus a Sinclair, 2018). Trehalóza je hlavní formou „krevního“ cukru u hmyzu (Reyes-DelaTorre a kol., 2012). Díky své nereaktivní povaze (neredukující cukr) a celkem dobré rozpustnosti ve vodě může být skladována coby energetická rezerva, nebo akumulována coby inertní osmolyt dehydratujících buněk (Crowe, 2007). Zároveň má trehalóza výjimečnou schopnost stabilizovat dehydratované biologické membrány a proteiny (Crowe a kol., 1984; Kaushik a Bhat, 2003). A má také silnou schopnost stimulovat přechod vodných roztoků do amorfni fáze skla (Clegg a kol., 1982). Trehalóza je tak často zmiňovaným svorníkem v úvahách o jednotném biochemickém systému ochrany před suchem a chladem/mrazem (Ring, 1998, Benoit a kol., 2007). Zřejmě nejpřímější průkaz pro roli trehalózy při ochraně hmyzího organismu před suchem, chladem a mrazem byl získán pro larvy antarktických mušek *Belgica antarctica*. Benoit a kol. (2007) pomalu desikovali larvy při 98% vlhkosti a teplotě 4°C, až tyto ztratily 50% tělní vody. Autoři pozorovali, že během postupné desikace larvy trojnásobně zvyšují koncentraci trehalózy a zároveň se zvyšuje jejich schopnost přežít po zmrazení na -15°C. Důležité je to, že injekce trehalózy do kontrolních larev měla podobný kladný účinek na jejich mrazovou odolnost jako přirozená akumulace trehalózy během desikace.

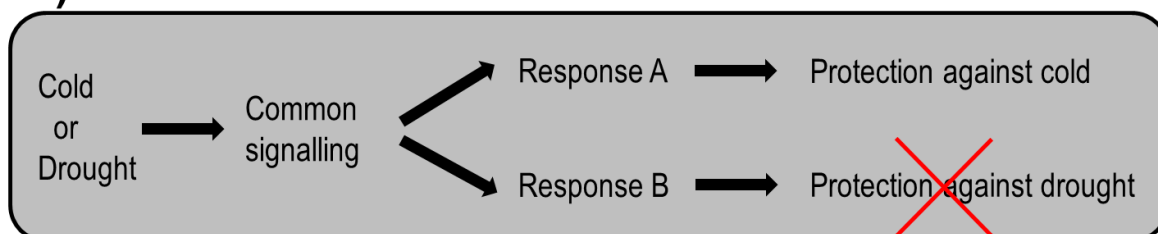
Výsledky všech předchozích pozorování, experimentů a úvah můžeme shrnout pod ekofyziologický koncept *cross-tolerance*, který je prezentován na Obrázku 6.



## A) Cross-tolerance



## B) Cross-talk



**Obr. 6: Koncept cross-tolerance. Upraveno podle Sinclair a kol. (2013).** Existují dvě teoretické možnosti základního uspořádání. Cross-tolerance (A) znamená, že dva různé stresory vyvolávají samostatné signalizační kaskády, které produkují odpovědi (molekuly) s ochrannými účinky proti oběma stresorům zároveň. Cross-talk (B) znamená, že dva různé stresory vyvolávají shodnou signalizační kaskádu, která produkuje různé odpovědi (molekuly), jež chrání před účinky jednoho či druhého stresoru.

Koncept cross-tolerance vychází z faktu, že jedinci hmyzu (nebo jakéhokoli jiného organismu) jsou ve svém přirozeném prostředí obvykle vystavováni různým kombinacím stresujících faktorů působícím zároveň, což favorizuje evoluci ochranných mechanismů, které jsou rovněž účinné proti více stresorům zároveň. Hypotetické mechanismy cross-tolerance se prakticky překrývají s mechanismy adaptivního komplexu chladové odolnosti tak, jak jsou představeny v předchozím textu: membrány (2.1.3.), antioxidanty (2.1.4.), nízkomolekulární cytoprotektanty (2.1.5.), HSP a LEA proteiny (2.1.6. a 2.1.7.).

Ačkoli se koncept cross-tolerance zdá být poměrně robustní z ekologicko-evolučního hlediska, empirická analýza jeho fyziologicko-biochemické podstaty je velmi obtížná právě kvůli vysoké komplexitě a provázanosti všech potenciálně zúčastněných mechanismů. Platí totéž, co již bylo výše řečeno pro mechanismy chladové a mrazové odolnosti: tyto mechanismy působí zásadně kooperativně nebo synergicky jako celý komplex najednou. Experimenty a funkční analýzy, které se zaměřují na jednotlivé prvky komplexu v izolaci (což je nutný, nebo alespoň pochopitelný redukcionistický přístup), mohou proto poskytovat pouze částečné nebo i zkreslené informace. V tomto ohledu představuje moje disertační práce ojedinelý pokus o empirickou analýzu biochemických mechanismů cross-tolerance k suchu a mrazu.

## 2.3. Modelový druh

Modelovým druhem mé disertační práce je muška z čeledi octomilkovitých, *Chymomyza costata* (Zetterstedt 1838) (Diptera, Drosophilidae), anglicky někdy *malt fly*. Rod *Chymomyza* čítá ca. 60 popsaných druhů, jejichž bionomie je však nedostatečně známá. Pouze *C. costata* se stala jedním z modelových druhů pro studium fotoperiodické regulace diapauzy, přezimování v chladných temperátních a subpolárních habitatech a fyziologie chladové odolnosti.

Taxonomické zařazení druhu je upřesněno na stránkách:

NCBI Taxonomy browser, ID 76946

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=76946>

NCBI Life map

<https://lifemap-ncbi.univ-lyon1.fr/?tid=7271>

*C. costata* se vyskytuje v celé chladné holarktické oblasti, a to i za polárním kruhem, kde je jedním z vůbec nejseverněji rozšířených druhů čeledi Drosophilidae (Hackman a kol., 1970; Toda, 1985). Naprostá většina druhů z čeledi octomilkovitých (nejméně 1 500 druhů) se vyskytuje v tropických oblastech (evoluční centrum je ve střední Africe) a má relativně slabé vyjádření diapauzy a nízkou chladovou odolnost. Jen relativně málo druhů se rozšířilo do temperátních nebo polárních pásů (Throckmorton, 1975; Strachan a kol., 2011). Temperátní druhy octomilkovitých přečkávají období zimy většinou jako dospělci, ve stavu reprodukční dormance, ať už typu hluboké diapauzy nebo mělké kviescence. U jediného druhu z celé velké čeledi byla popsána kukelní diapauza (*Drosophila alpina*, Lumme a kol., 1978) a pouze u tří druhů *Chymomyzy* (mezi nimi právě *C. costata*) a také u *Scaptodrosophila deflexa* je známa larvální diapauza (Basden, 1954). Ve své disertační práci pracuji s larválním stádiem *C. costata*.

### 2.3.1. Larvální diapauza *Chymomyza costata*

Přezimování larev *C. costata* v diapauzním stavu bylo popsáno jak u finských, tak u japonských populací (Lakoovara a kol., 1972; Enomoto, 1981). Podrobněji se diapauzou začala v 80-tých letech minulého století zabývat společná finsko-japonská skupina. Většina jejich výzkumu byla provedena na linii mušek, která pochází z několika jedinců odchycených v roce 1983 poblíž města Sapporo, ostrov Hokkaido, Japonsko (43.06°N, 141.35°E). Výzkum byl stimulován izolací nediapauzní linie mušek, která se spontánně objevila v laboratorním chovu již v prvních letech po odchytu v přírodě. Tato linie nereagovala na krátkodenní signál, který jinak velmi spolehlivě vyvolává diapauzu u prakticky všech larev divokého typu (Rihimaa a Kimura, 1988). Další genetická analýza naznačila, že ztráta fotoperiodické citlivosti larev byla patrně způsobena mutací jediné recesivní alely neznámého genu (lokusu), který je uložen na autozomech. Genový lokus dostal název NPD, Non Photoperiodic

Diapause, což reflektuje skutečnost, že larvy mohou sice vstoupit do dormantního (kviescentního) stavu jsou-li vystaveny nízkým teplotám (<LDT, <11°C), ale samotný fotoperiodický signál aplikovaný za relativně vysoké teploty (18°C) diapauzu neindukuje (Riikimaa a Kimura, 1989). Linie NPD se tak stala vhodným modelem pro studium genové a molekulární podstaty fotoperiodismu u hmyzu.

Debata o podstatě tzv. fotoperiodického kalendáře se vedou již dlouhá desetiletí (Bunning, 1958; Pittendrigh, 1960) a v poslední době převažuje názor, že fotoperiodický kalendář (schopnost rozpoznávat délku dne a reagovat na ni komplexní změnou fenotypu, tedy například vstupem do diapauzy) je založen na specifických interakcích v neuronální síti tzv. hodinových neuronů v mozku hmyzu (Saunders, 2002; Košťál, 2011). K podpoře tohoto názoru přispěl právě také výzkum provedený na modelu linie NPD *C. costata*. Nejprve bylo pomocí formálních experimentů (sledování odpovědi na fotoperiody s celkovou délkou >24 h; experimenty s dlouhou nocí přerušovanou krátkým zábleskem světla apod.) zjištěno, že měření délky dne (resp. noci) se u larev *C. costata* účastní blíže nespecifikovaný faktor s cirkadiánní rytmičností (Yoshida a Kimura, 1995; Lankinen a Riikimaa, 1997; Košťál a kol., 2000). Analýzou hodinového genu *period*, bylo zjištěno, že tento vykazuje denní a cirkadiánní rytmy v expresi u divoké linie larev, kdežto exprese je nízká a nerytmická u NPD linie larev (Košťál a Shimada, 2001). Transkripty dalšího hodinového genu *timeless* nebyly u NPD linie ani detekovatelné, zatímco u divoké linie opět vykazovaly typický denní rytmus exprese. Zároveň, narušení exprese genu *timeless* pomocí RNAi vedlo ke ztrátě fotoperiodické citlivosti larev (Pavelka a kol., 2003). Protein TIM byl lokalizován do dvou neuronů larválního mozku v každé hemisféře a tam vykazoval denní rytmičnost u divoké linie. U linie NPD nebyl protein TIM detekován vůbec (Stehlík a kol., 2008). Tyto výsledky naznačily, že porucha funkce cirkadiánních hodin v mozku NPD larev může souviset se ztrátou funkce fotoperiodického kalendáře. Sekvenováním genového lokusu *tim* bylo zjištěno, že recesivní alela tohoto genu nese u NPD linie dlouhou delecii (1 855 párů bází) v 5'-UTR regionu. Tato delece odstranila start transkripce a také regulační elementy tzv. E-boxů a TER-boxů (Stehlík a kol., 2008). Postupným umělým zkracováním sekvence bylo zjištěno, že zkrácenými konstrukty-transfekované hmyzí S2 buňky potřebují k expresi genu *tim* právě ty promotorové úseky, které jsou u NDP linie odstraněny mutací (Kobelková a kol., 2010). Je tedy možné, že lokus NDP je obsazen genem *tim* a tento hodinový gen může představovat molekulární spojnici mezi funkcemi hodin a kalendáře.

Larvy *C. costata* byly rovněž využity jako model pro detailní charakterizaci faktorů indukujících diapauzu u hmyzu (Košťál a kol., 2016). Často se v literatuře nesprávně uvádí, že diapauza hmyzu je indukována nízkou teplotou (nebo primárně nízkou teplotou). Hlavním indukčním faktorem jsou však ty signály z prostředí, které mají rytmický charakter a kódují tak kalendářní čas – fotoperioda a také termoperioda. Tyto rytmické signály mohou bezpečně indukovat diapauzu larev *C. costata* i když jsou aplikovány jednotlivě, nezávisle. Jestliže jsou oba aplikovány souběžně, larvy se řídí pouze fotoperiodickou informací. Další faktory

(teplota, hustota populace, přístup k potravě) hrají druhotnou roli a modifikují odpověď na primární rytmické faktory. Dále byla diapauza larvy *C. costata* použita jako model pro charakterizaci jednotlivých ekofyziologických fází diapauzního vývoje hmyzu (Poupardin a kol., 2015; Košťál a kol., 2017). Zjednodušená představa o diapauze jako o statickém stavu byla nahrazena modelem dynamických změn v genové expresi a fyziologii, které běží spontánně (endogenně, beze změny vnějších podmínek), zároveň reagují na (exogenní) změny vnějších podmínek, a tím vedou k postupné terminaci diapauzy (ukončení diapauzy) během zimního období.

### 2.3.2. Chladová odolnost *C. costata*

První studie chladové odolnosti larev označila podchlazování (freeze-avoidance) za hlavní strategii larev *C. costata* pro přežití podnulových teplot (Enomoto, 1982). Tato klasifikace byla založena na měření bodu podchlazení (SCP) který byl sice položen relativně nízko (okolo  $-20^{\circ}\text{C}$ ), ale dnes víme, že toto je hodnota typická pro většinu larev octomilkovitých, včetně *D. melanogaster*, které mají velmi slabou odolnost vůči chladu a hynou během několika minut vystavení teplotě  $0^{\circ}\text{C}$  (Košťál a kol., 2011a). Nízká hodnota SCP sama o sobě tedy nemusí automaticky znamenat silnou chladovou odolnost (připomeňme, že podchlazování je přirozenou vlastností vodných roztoků). Nedlouho na to byla klasifikace strategie opravena na promrzání (freeze-tolerance) (Shimada a Riihimaa, 1988). Ukázalo se totiž, že larvy *C. costata* jsou silně citlivé k inokulaci okolním ledem (který se běžně vyskytuje v jejich zimovišti pod kůrou padlých stromů), začínají promrzat již při mírných podnulových teplotách, a pokud je tempo jejich mrznutí pomalé, dokáží přežít zmrazení i na teploty  $-100^{\circ}\text{C}$  (Shimada a Riihimaa, 1990). Stejní autoři prokázali, že další podstatnou podmínkou pro přežití larev za extrémně nízkých teplot je předchozí vstup do diapauzy a chladová aklimace ( $4^{\circ}\text{C}$ , 1 měsíc, konstantní tma). Larvy, které vstoupily do fotoperiodické diapauzy vyvinuly o něco silnější toleranci k promrzání než larvy, které byly „přinuceny“ k dormanci pouhým snížením teploty (kviescentní). Chladová aklimace larev byla doprovázena akumulací dvou látek s potenciálně kryoprotektivními účinky, prolinu (až  $175 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ FM}$ ) a trehalózy (až  $37 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ FM}$ ). V roce 1996 bylo potom publikováno pozorování, že larvy dokáží přežít i po zchlazení na teplotu kapalného dusíku ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) (Moon a kol., 1996). Tím se larvy *C. costata* staly velmi atraktivním modelem pro studium možnosti kryoprezervace celého komplexního živočišného organismu. Současná kryobiologie dokáže v kapalném dusíku dobře skladovat buňky nebo relativně jednoduchá embrya, ale velké problémy nastávají již v případě jednoduchých tkání (vaječníky, ledviny), a kryoprezervace jiných orgánů nebo dokonce celého organismu byla donedávna považována za téměř vyloučenou (Fahy a Wowk, 2015). Je třeba doplnit, že se jedná o organismy v plné hydrataci (jako je larva *C. costata*), nikoli o anhydrobiotické organismy, které byly před zamražením zbaveny vody (semena rostlin, embrya různých bezobratlých, želvušky apod.).

Koštal a kol. (2011b) ověřili schopnost larev přežívat expozici v kapalném dusíku a metabolickým profilováním potvrdili také akumulaci prolinu a trehalózy během chladové aklimace diapauzních larev. Navíc zjistili, že vstup do diapauzy a chladová aklimace jsou spojeny s celkovým zvýšením osmotické koncentrace hemolymfy až na  $700 \text{ mOsmol.kg}^{-1}$ ; s relativním úbytkem osmoticky aktivní (promrazitelné) vody; a se zvýšenou náchylností procházet při mražení skelným přechodem. Podobné změny všech výše uvedených parametrů byly pozorovány také u nediapauzních larev, které byly krmeny na dietě obohacené o prolin. Nediapauzní, v teple aklimované larvy nepřežívají promrznutí a kryoprezervaci. Po krmení na prolinové dietě se však tato schopnost u nich „objevila“. V následné práci (Koštal a kol., 2012) se podařilo pomocí relativně jednoduchých manipulací „přeměnit“ larvu tropické, a k chladu velmi citlivé, octomilky *D. melanogaster* na organismus, který toleruje zmrznutí při  $-5^\circ\text{C}$ . Podmínkami pro přežití po zmrznutí byly opět: předběžná chladová aklimace a zastavení vývoje chladovou kviescencí; krmení na dietě obohacené prolinem; včasná inokulace larev ledem z okolí; a pomalé tempo mražení.

Další intenzivní kolo výzkumu chladové odolnosti *C. costata* (od roku 2017 dodnes) již probíhalo paralelně s mými vlastními experimenty, které uvádím jako výsledky své disertační práce v samostatné kapitole č. 4. V roce 2018 publikovali Rozsypal a kol. (2018) srovnávací analýzu teplotních dynamik fázových přechodů tělní vody na led, popřípadě na skelnou fázi, u larev *C. costata* i *D. melanogaster*. Různě aklimované a různě krmené larvy byly inokulovány ledem a pomalu mrazeny v diferenciálním skenovacím mikro-kalorimetru (DSC). Technika DSC umožňuje zachytit a fyzikálně proměřit fázové přechody tělní vody. Oba druhy vykazovaly relativně malé vzájemné rozdíly v teplotních dynamikách fázových přeměn. Shrnuji hlavní výsledky pouze pro larvy *C. costata* odolného fenotypu (freeze-tolerant, diapauzní a chladově aklimované): bod tání (m.p,  $-1,0^\circ\text{C}$ ) zhruba odpovídá dříve zjištěné osmolaritě hemolymfy; k inokulaci okolním ledem dochází za teplot mezi  $-2$  až  $-3^\circ\text{C}$ ; po inokulaci frakce ledu rychle roste (viz. Obr. 5) a blíží se maximu ( $67,9\%$  veškeré tělní vody) již při dosažení teploty  $-10,5^\circ\text{C}$ ; při dalším poklesu teploty až na  $-196^\circ\text{C}$  již frakce ledu výrazně neroste (znamená to, že ca.  $32,1\%$  vody je vázaných, nepromrazitelných); přechod do amorfni skelné fáze začíná po dosažení teploty  $-20^\circ\text{C}$  a je ukončen po dosažení teploty  $-30^\circ\text{C}$ . Velmi podstatné bylo poslední zjištění: přežití za kryoprezervace je zaručeno pouze tehdy, pokud jsou larvy ponořeny do kapalného dusíku za teplot nižších než  $-30^\circ\text{C}$ , tedy až po kompletaci skelného přechodu.

Dále byly využity různé mikroskopické techniky s cílem identifikovat mikro-morfologické změny v průběhu mražení larev *C. costata* a vytipovat tak tkáň nebo struktury, které jsou maximálně citlivé k poškození mrazem. Kombinace světelné a konfokální mikroskopie odhalila rozpad cytoskeletálních struktur tubulinu a aktinu, a to zejména v tukové tkáni larev (Des Marteaux a kol. 2018b). Zároveň byla pozorována silná koalescence lipidických kapének (v důsledku mrazové dehydratace cytosolu). Není zřejmé, zdali tato koalescence primárně způsobuje sekundární rozpad radiální struktury tubulinových vláken nebo naopak, jestli

rozpad tubulinu umožňuje koalescenci. Dále byla pozorována agregace aktinových mikrofilament v kortikální vrstvě tukových buněk. Larvy odolného fenotypu vykazovaly slabší destruktivní změny cytoskeletu než larvy citlivého fenotypu (freeze-sensitive, nediapauzní, aklimované v teple). Krmení citlivých larev na dietě obohacené prolinem však vedlo k významnému snížení destruktivního poškození cytoskeletu.

Elektronová mikroskopie umožnila ještě podrobnější vhled do mikro-morfologie tkání promražených larev *C. costata* (Štětina a kol., 2020). Citlivé larvy vykazovaly silnou tendenci k patologickým změnám mitochondrií – od zvětšování a zakulacování, přes ztrátu struktury krist na vnitřní membráně, až k prasknutí vnější i vnitřní membrány a vylití obsahu mitochondrie do cytosolu. Intenzita změn negativně korelovala s přežitím larev a tyto změny byly pozorovány v tukové tkáni, v zadním střevu a později rovněž ve svalové tkáni (Štětina a kol., nepublikovaná data). Zároveň byla pozorována ztráta respirační kapacity tkání, ale paradoxně nikoli ztráta aktivity enzymu citrát syntázy, který je běžně používán jako marker mitochondriální aktivity a je považován za silně citlivý k chladovému a mrazovému poškození. Opět, stejně jako v předchozí práci, patologické změny mitochondrií nebyly patrné u odolného fenotypu larev a byly značně potlačeny u larev citlivého fenotypu, které byly krmeny na prolinové dietě. Všechny experimenty tedy ukazují, že inkorporace prolinu do metabolismu larev má podstatné, mikroskopicky detekovatelné efekty na rozvoj i reparaci mrazového poškození tkání larev *C. costata*.

Poslední paralelní studie s přímým vztahem k mojí disertační práci se detailně zabývala metabolickými drahami pro biosyntézu a katabolismus potenciálně kryoprotektivních metabolitů u larev *C. costata* (Moos a kol. 2022). Pomocí srovnávací metabolické a transkriptomické analýzy, doplněné o sledování metabolických toků pomocí značených prekurzorů, byly vytvořeny tři metabolické mapy (navzájem propojené), které ukazují zdroje a metabolické dráhy zapojené do akumulace kryoprotektantů během vstupu do diapauzy a následné chladové aklimace larev *C. costata*. Dosud byly za hlavní zdroje pro syntézu a akumulaci kryoprotektantů považovány makromolekulární zásoby ve formě proteinů (sérové proteiny, proteiny extracelulární matrix), glykogenu a lipidů. Studie ukazuje, že značná část kryoprotektantů však pochází z látek asimilovaných z larvální diety (diapauzní larvy aklimované na 4°C totiž stále pokračují v pomalém příjmu potravy, což bylo neočekávané zjištění). Hlavním kryoprotektantem larev *C. costata* je prolin (aklimované larvy obsahují v průměru 55 µg prolinu na jednu průměrnou larvu o hmotnosti 2 mg). Nejméně 1/2 tohoto množství pochází z asimilace prolinu a jeho prekursoru glutamátu z potravy. Další velká část prolinu se tvoří metabolickou konverzí glutaminu, který byl akumulován v časných fázích diapauzního vývoje (před chladovou aklimací). Malé části akumulace prolinu lze vysvětlit metabolickou konverzí ornitinu a také degradací kolagenů v extracelulární matrix (které byly dosud hypoteticky uvažovány jako hlavní zdroj prolinu). Glykogenové zásoby jsou patrně hlavním zdrojem glukózových jednotek pro konverzi na trehalózu (27 µg na jednu aklimovanou larvu) a další minoritní cukerný kryoprotektant sorbitol. Konverze fosfolipidů

jsou patrně hlavním zdrojem dosud velmi málo prostudované třídy hmyzích kryoprotektantů, která zahrnuje jednak glycerofosfo-cholin a glycerofosfo-etanolamin a dále metylaminy betain a sarkosin. V případě betainu a sarkosinu by alternativním zdrojem mohla být postupná metylace glycinu uvolněného degradací kolagenů (kolageny jsou tvořeny především glycinem, prolinem a hydroxyprolinem). Fluxomika se značeným glycinem však tuto dráhu nepotvrdila, a naopak, byla potvrzena postupná de-methylace cholinu na betain, dimetylglycin a sarkosin.

### **3. Cíle disertační práce**

Cílem mé disertační práce bylo provést „srovnávací a funkční analýzu kryo-protektivních účinků vybraných nízkomolekulárních a vysokomolekulárních látek“ (formulace, jak je uvedena v Plánu doktorského studia ze 20. 7. 2017). V průběhu pěti-letého studia byl tento plán zpřesňován podle výsledků konkrétních experimentů a byly konkretizovány tyto cíle:

#### **1. Provést transkriptomickou analýzu odpovědi larev *C. costata* na chladovou aklimaci.**

Cílem bylo odhalit procesy a metabolické dráhy, které jsou ovlivněny chladovou aklimací, a vytipovat kandidátní geny, jejichž proteinové produkty by mohly hrát roli kryoprotektivních látek.

#### **2. Ověřit přítomnost genů kódujících LEA-like proteiny v genomu *C. costata*.**

Pokud by tyto geny byly v genomu přítomny, dalšími cíli bylo provést srovnávací analýzu jejich exprese v odpovědi na chladovou aklimaci a na aklimaci v suchu, pokusit se připravit rekombinantní proteiny v umělých expresních systémech a použít je jednak ke generování specifických protilátek a případně také k přímému testování kryoprotektivní funkce (ochrana enzymů před denaturací, ochrana membrán před ztrátou integrity).

#### **3. Provést srovnávací metabolomickou analýzu odpovědí larev *C. costata* na chladovou aklimaci a na aklimaci v suchém prostředí.**

Cílem bylo posoudit, zdali ekologická rizika mrazové a evaporační dehydratace larev mohla v evoluční historii larev vést ke cross-toleranci na principu sdílených aklimačních změn v metabolismu, zejména s ohledem na akumulaci látek s obecně cytoprotektivními účinky. Součástí tohoto cíle bylo ověřit, zdali larvy *C. costata* tolerují vysychání a jestli aklimace larev v suchu vede ke změně jejich tolerance k chladu a mrazu.



## 4. Výsledky disertační práce

Výsledkem mojí disertační práce jsou tři publikace a dále soubor dosud nepublikovaných výsledků navazujících na publikaci č. 1.

### 4.1. Publikace č. 1

Reprint: Příloha č. 1

Název: **Transcriptional analysis of insect extreme freeze tolerance.**

Autoři: Lauren E. Des Marteaux, Petr Hůla a Vladimír Košťál

doi: <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.2019>

Hlavní výsledky:

Aklimovali jsme diapauzní larvy *C. costata* s cílem získat tři fenotypy (zkráceně: LD, SD a SDA), které se významně liší úrovní freeze-tolerance včetně schopnosti přežít po kryoprezervaci v kapalném dusíku. Tyto tři varianty vycházejí z dřívějších publikací (Košťál a kol., 2011b; 2017; Rozsypal a kol., 2018), opakovaně je využíváme v dalších experimentech a budu se k nim vracet i v následujících kapitolách, proto zde uvádím jejich podrobnější charakterizaci:

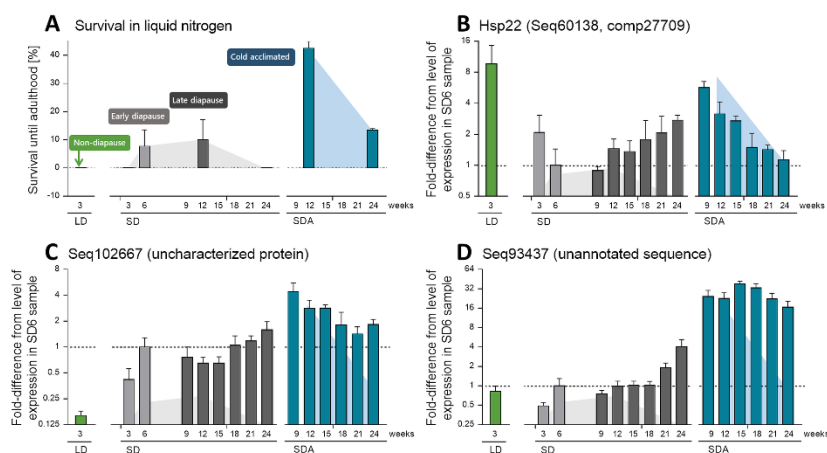
LD (*Long-Day*) larvy jsou vychovány za dlouhého dne (L16:D8) a konstantní teploty 18°C. Tyto larvy jsou aktivní, procházejí tzv. přímým vývojem (nevstupují do diapauzy), ve věku ca. 20–24 dnů se kuklí a dále metamorfují na imaga. Larvy jsou odebírány v tzv. *pre-wandering stage*, tzn. ve věku 17–19 dnů, kdy jsou již blízko své finální velikosti (hmotnost do 2 mg), budou brzy ukončovat žír a přecházet do tzv. *wandering stage* před vlastním kuklením. Podstatné je, že tyto aktivní a v teple aklimované larvy mají relativně nízkou freeze-toleranci (pouze 40% přežívá promrznutí při -5°C, žádná nepřežije promrznutí při -10°C, žádná nepřežije kryoprezervaci v kapalném dusíku).

SD (*Short-Day*) larvy jsou vychovány za krátkého dne (L12:D12) a konstantní teploty 18°C. Tyto larvy vstupují do larvální diapauzy. Jejich růst je mírně pomalejší než v LD podmínkách a jejich vývoj (vývoj primordiálních struktur známých jako imaginální disky) je zcela zastaven ve fázi odpovídající časnému třetímu instaru. Larvy jsou odebírány v různém věku (např. SD3, SD6, SD11; tedy ve 3, 6, nebo 11 týdnech). Larvy SD3 ještě pokračují v žíru a akumulují zásoby pro diapauzu, larvy SD6 jsou blízko maximální hmotnosti (ca 2 mg), zpomalují nebo zastavují žír, a larvy SD11 jsou již v hluboké diapauze. Spolu se vstupem do diapauzy se mírně zvyšuje freeze-tolerance larev a schopnost přežít v kapalném dusíku, která ovšem u starších larev (SD24) opět klesá.

SDA (*Short-Day-Acclimated*) jsou diapauzní larvy, které jsou po dosažení věku 6 týdnů (ve fázi SD6) převedeny do postupné chladové aklimace za stálé tmy: 1 týden 11°C, 4 týdny 4°C (SDA11 jsou tedy 11 týdnů staré, diapauzní a chladově aklimované larvy). Tyto larvy mají maximální freeze toleranci (přežívají promrznutí při -75°C stejně dobře jako nezmražené kontroly, 42% larev přežívá a metamorfuje do stádia dospělce po kryoprezervaci v kapalném dusíku).

Ve spolupráci s EMBL Genomics Core Facility (Heidelberg, Německo) jsme syntetizovali cDNA knihovny všech tří fenotypů larev a podrobili je NextGen sekvenování pomocí Illumina NextSeq 500. Získali jsme přibližně 304 miliónů sekvencí krátkých úseků cDNA (reads), které jsme sestavili do 113 447 kontigů na základě námi dříve publikovaného transkriptómu *C. costata* (Poupardin a kol., 2015). Na těchto datech byla provedena bioinformatická analýza s cílem identifikovat sekvence, které jsou specificky četnější nebo naopak méně četné v párových srovnáních SD11 vs. SD6 a SDA11 vs. SD6 (DE analýza, differential expression, pomocí edgeR Bioconductor Package for R). Dále jsme hledali celé komplexní procesy, které jsou signifikantně ovlivněny chladovou aklimací (analýza pomocí KEGG pathways enrichment).

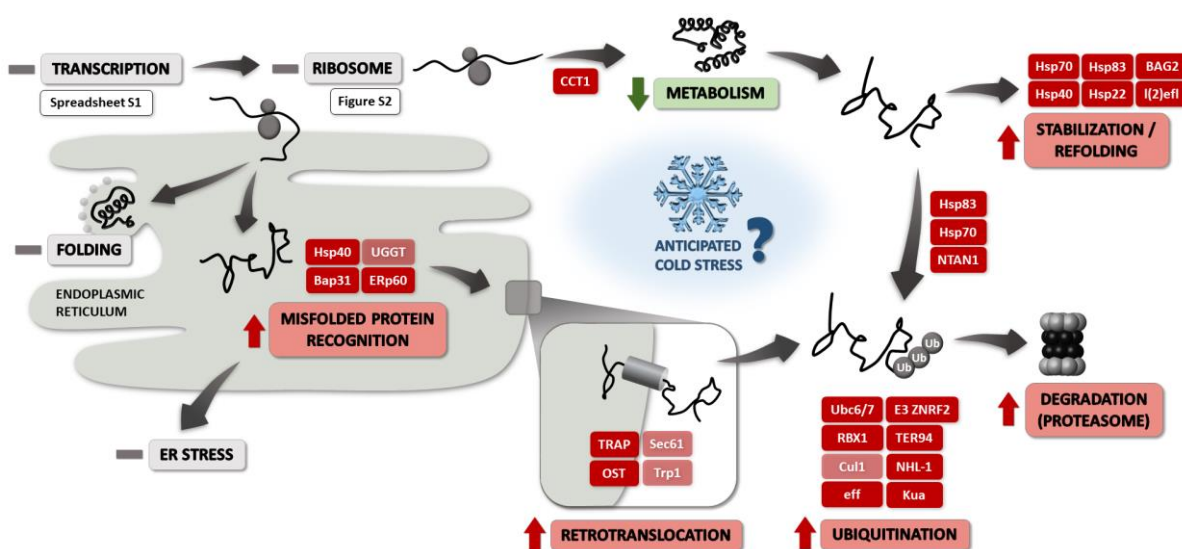
Pro DE analýzu sekvencí jsme použili poměrně přísný práh (cut off) 4-násobného rozdílu v expresi ( $\log_2$  fold change > 2) při prahu statistické významnosti (FDR-adjusted  $p$  value) < 0.05 (k tomuto prahu se vrátím v kap. 4.2.7. v souvislosti s diferencíální expresí LEA-like sekvencí). Více sekvencí (776) bylo signifikantně četnějších (upregulovaných) po aklimaci v chladu (SDA vs SD6) než v kontrolním srovnání (SD11 vs SD6, pouze 190 upregulovaných sekvencí). Zároveň, žádné DE sekvence se navzájem nepřekrývaly mezi oběma srovnáními – což ukazuje, že chladová aklimace je proces zásadně odlišný od pouhého diapauzního vývoje a dále že tento proces je závislý na aktivní upregulaci četných genů (navzdory tomu, že se jedná o přechod z vysoké teploty 18°C do nízké teploty 4°C). Seznamy a anotace diferencíálně exprimovaných sekvencí jsou uvedeny v elektronické příloze publikace. Validace výsledků pomocí qRT-PCR vybraných sekvencí potvrdila, že výsledky RNAseq analýzy jsou spolehlivé. Pro rozšířenou validaci výsledků jsme připravili další fenotypické sub-varianty (SD9, SD12, SD15, SD21, SD24, a také SDA9, SDA12, SDA15 a SDA24), abychom lépe postihli vývoj exprese různých genů v průběhu diapauzy a mohli jej přesněji korelovat s přežíváním v kapalném dusíku. Takto jsme identifikovali kandidátní sekvence, jejichž expresní profily velmi přesně kopírovaly vývoj freeze-tolerance larev – příklady jsou uvedeny na Obrázku 7. Dvě z těchto sekvencí (Seq60138 a Seq102667) jsme později podrobili analýze exprese po aklimaci v suchu spolu se sekvencemi, které pravděpodobně kódují LEA-like protein (podrobněji viz kapitola 4.2.).



**Obr. 7. Přežívání larev *C. costata* po kryoprezervaci v kapalném dusíku (A) a exprese vybraných sekvencí během chladové aklimace (B-D).** Panel A ukazuje, že schopnost larev přežít kryoprezervaci se objevuje se vstupem do diapauzy (SD6, SD12), v pozdní diapauze za vysoké teploty však opět postupně mizí (SD24). Maximální přežití vykazují larvy těsně po chladové aklimaci

(SDA12). Panely B-D ukazují změny relativní četnosti mRNA transkriptů pro tři vybrané sekvence (četnost je měřena ve srovnání s četností mRNA transkriptů čtyř různých referenčních genů pomocí metody qRT-PCR a ddC<sub>T</sub>). Expres u SD6 larev je položena = 1 a exprese v ostatních fenotypech je znázorněna jako rozdíl od SD6 (fold-difference) na logaritmické ose y. Převzato z publikace č. 1 (Fig. 3).

Diferenciální analýza KEGG procesů odhalila, že dva hlavní procesy, které jsou upregulovány v průběhu chladové aklimace jsou: (1) zpracování proteinů v endoplazmatickém retikulu (ER) (ko04141, Protein processing in endoplasmic reticulum) (Obr. 8); a (2) degradace proteinů v proteazómech (ko03050, Proteasome) (Obr. 9).

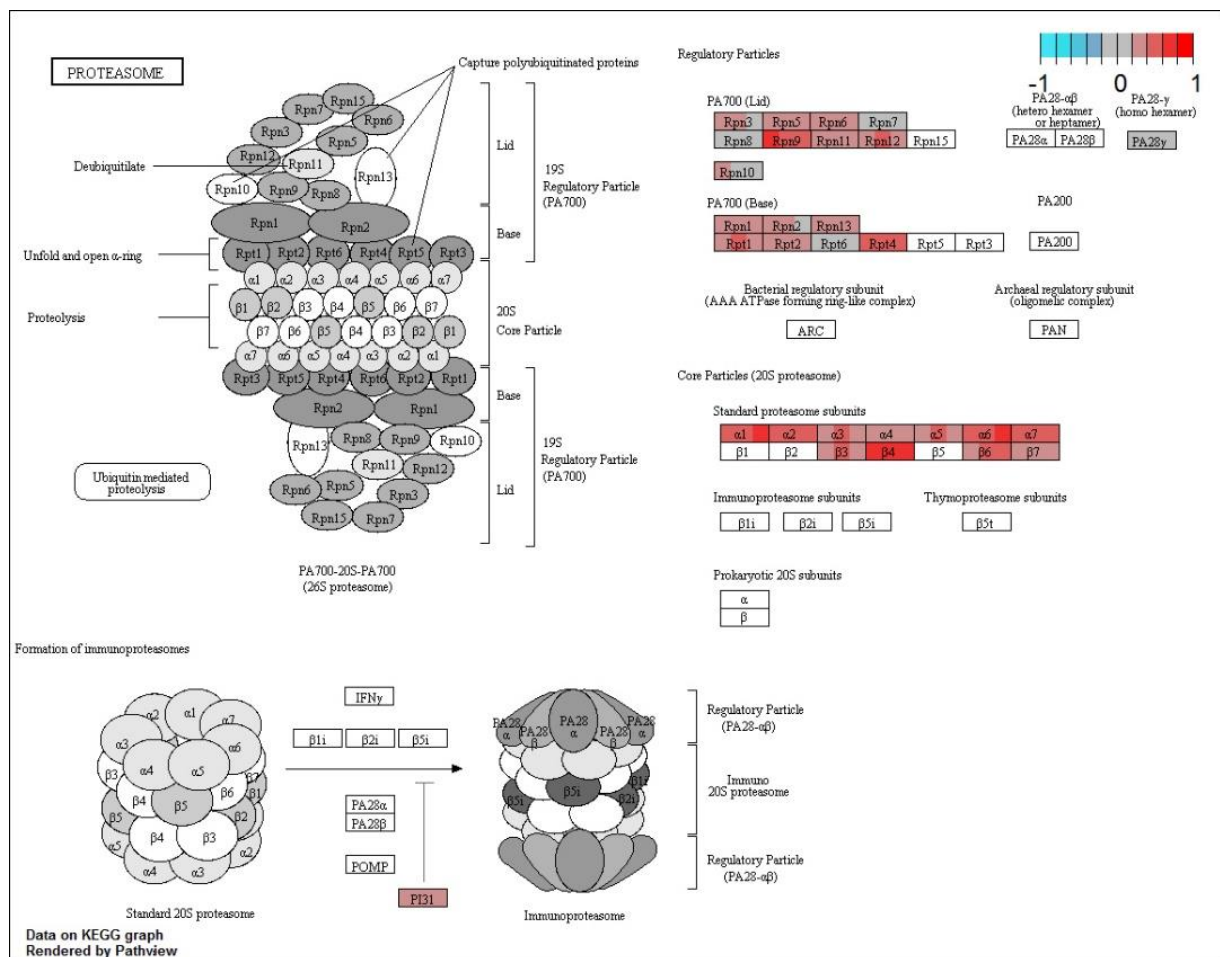


**Obr. 8. Zpracování proteinů v endoplazmatickém retikulu.** Vizualizace výsledků KEGG enrichment analýzy se zaměřením na ER (KEGG ko04141). Obrázek ukazuje pouze ty sekvence, které byly významně upregulovány během chladové aklimace (červené obdélníky). Procesy, které byly v průběhu chladové aklimace downregulovány, jsou vyznačeny zeleně (Metabolism), procesy, které zůstaly beze změny, jsou vyznačeny šedě (např. Transcription), a procesy, které byly upregulovány jsou vyznačeny červeně (např. Retrotranslocation). Více detailů je v textu kap. 4.1. Převzato z publikace č. 1 (Fig. 2).

Obrázek 8 ukazuje, že procesy spojené s rozpoznáváním (Recognition) chybně složených proteinů, jejich exportem z ER (Retrotranslocation) a směřováním k degradaci v proteazómech pomocí značení ubikvitinem (Ubiquitination) jsou významně posíleny

během chladové aklimace. Zároveň lze pozorovat zvýšenou transkripci genů kódujících šokové proteiny (šaperony), které mohou stabilizovat částečně denaturované proteiny v cytosolu (Stabilization/Refolding), popřípadě je opět směřovat pomocí ubiquitinace k degradaci v proteazómech. Současně je významně upregulována značná část podjednotek tvořících proteazóm (Obr. 9). U kontrolního srovnání (SD11 vs SD6), tedy v průběhu pouhého udržování diapauzy za relativně vysoké teploty 18°C, vidíme sice také mírné zvýšení četnosti transkriptů souvisejících s procesy v ER, ale četnost a míra těchto změn je podstatně nižší než během chladové aklimace.

Důležitý je fakt, že ačkoli je celá kaskáda dějů spojených s rozpoznáváním a odstraňováním chybně složených proteinů během chladové aklimace silně posílena, tak toto nemá za následek posílení drah, které vedou k iniciaci stresové odpovědi (ER Stress). To nás vede k hypotéze, že upregulace těchto procesů je do značné míry profylaktivní (modrý ovál na Obrázku 8, Anticipated cold stress).



**Obr. 9. KEGG pathway ko03050, Proteasome.** Výstup z KEGG Pathway Enrichment analýzy pro srovnání SDA11 vs SD6, tedy pro chladovou aklimaci. Vidíme, že celá řada podjednotek, které tvoří aktivní proteazóm, vykazuje signifikantní upregulaci své genové exprese (červená pole), zatímco žádná podjednotka nevykazuje downregulaci (modrá pole). Převzato z elektronické přílohy publikace č. 1 (Fig. S9).

## 4.2. Dosud nepublikované výsledky navazující na publikaci č. 1

### 4.2.1. Sekvenování kontigů Seq60138 a Seq102667

Na základě výsledků publikace č. 1 (Obr. 7) jsme se rozhodli použít kandidátní sekvence Seq60138 a Seq102667 pro další studium. Prvotní anotace těchto sekvencí pomocí algoritmu BLASTx proti nr proteinové databázi NCBI (Geneious v. 9.1.8., Biomatters Ltd.) naznačila, že sekvence Seq60138 kóduje malý šokový protein Hsp22 a sekvence Seq102667 kóduje dosud necharakterizovaný protein vyskytující se u různých druhů rodu *Drosophila*. Protein Hsp22 je strukturně i funkčně poměrně dobře charakterizovaný. Jedná se o konzervovaný, stresem-indukovaný malý šokový protein s lokalizací v mitochondriální matrix (Haslbeck a Vierling, 2015). Je známo, že Hsp22 stabilizuje částečně denaturované proteiny, které se objevují v mitochondrii po vystavení různým stresovým faktorům (Morrow a kol., 2015; Colinet a kol., 2010b) a ve zvýšené míře je rovněž exprimován v mitochondriích stárnoucích much, které patrně chrání před oxidativním stresem (Morrow a kol., 2000).

Ověřil jsem strukturu kódujících sekvencí (CDS) obou kontigů pomocí sekvenování (Eurofins) PCR produktů. PCR produkty jsem získal z cDNA templátu larev *C. costata* a použitím různých kombinací oligonukleotidových primerů. Zároveň jsem provedl 3'-RACE reverzní transkripci a takto vzniklou cDNA jsem použil jako templát PCR reakcí za účelem zjištění struktury 3'-koneců obou sekvencí. Výsledkem jsou kompletní ověřené kódující sekvence:

#### Seq60138 (Hsp22)

555bp

```
ATGCGTTCATTACCTATGTTTTTGGCGCATGGCGGAGGAGATGACACGCCTGCCACGTGTGTCTCCATT  
TCAAGCATTCTTTTCGCGACCCCTTTTGGACCGCTGCGCCGATTCACGCAATGGCAACAGATTGCAC  
GCTGGCAGGAACAACAATATGCAACACCAGCTAGTGTGGGCAAAAATGGCTATCAAGTCTCGCTAGAT  
GTGAGCGAATTCAAGCCCAATGAGCTGACGGTCAAACGATTAATAACAGCGTGGTCATCGAAGGCAA  
ATGTGAGCAACACGAGGATGAACAAGGTGGCTACAGCTCACGCCATTTTTTGGCAGCCTTTGTCTCCTGC  
CCGAGGGCTACGAGGCAGATAAGGCCATCTCCACCTAAGCTCTGACGGTGTGCTTACCGTGAGTGTG  
CCCAATCCACCAGCCGTTGAGGAGGCCATGAAGGAGCGTGTCTGTCGCCATACAGCAAACCTGGACCAGC  
GGAGCTTAATATCAAGCCGAATCCGCCATTGAAGCTGACGCTGAGGCGGGTAAAAAAGAAGCCGAGC  
AGAAGCAA
```

#### HSP22 protein

MW = 20,7 kDa

```
MRSLEPMFLRMAEEMTRLPRVSPFQAFFRDPFWTAAPIPRNWQQIARWQEQQYATPASVGKNGYQVSLD  
VSEFKPNELTVKTIINNSVIEGKCEQHEDEQGGYSSRHFLRRFVLPEGYEADKAI STLSSDGVLTVSV  
PNPPAVEEAMKERVVPIQQTGPAELNIKPNPPIEADAEAGKKEAEQKQ*
```

Šedivě označený 5'-konec sekvence HSP22 je mitochondriální lokalizační signál detekovaný pomocí nástroje Target P-2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TargetP-2.0>) (pravděpodobnost výskytu: 0,804).

## Seq102667

477bp

```
ATGTCGCCCCACAGTTCGGTAGGCTGCGCCATGTTGCTTTTGATGCTGTGCTCCCTTGCCGCATGTTT
TAATGCAGGTGATGCAGTACTACGCTGTTGGCGTTGCTCCACGGATGTCTCCAATGGTGAATTCTGCA
ATGATCCCTTTTCAGCCGGATAGCATATCAGAGCAACAACGTTATTGGAGCTTTGTCAATTGCACCTAT
TCCGTCGGCGTCAAGTCCGTAATGCGAGACCTGTCTGCAAGAAGCTGGTGCAGGAAATTTATGGCAA
GCGCGTTATCGCGGTTTCCTGCTTCTACGAGGATATGGATGATGCCCCAGACAAGTGTGCCATGGACA
CAACCTCGTCCTATATAAAGACCGTCTATTGCCGCACTTGACCAGCGATGGTTGCAACGGAGCCTCA
AGCTTTATGCCTCTAACAGGACTTATAATACTGCCGTTACTTGCCTGTACTCGCAGTTATGCAAAATG
A
```

## Protein ze Seq102667

MW = 17415.7 kDa

```
MSPHSSVGCAMLLMLCSLAACFNAGDAVLRWCRCSTDVSNGEFCNDPFQPDSEIQQRYWSFVNCTY
SVGVKSVNARPVCKKLVQEIYGKRVIARSCFYEDMDDAPDKCAMDTTSSYIKTVYCRTCCTSDGCNGAS
SFMPLTGLIILPLLALYSQLCK*
```

Šedivě označený 5'-konec sekvence Seq102667 je lokalizační signál SP (*Secretory Pathway*) detekovaný pomocí nástroje Target P-2.0 (pravděpodobnost výskytu: 0,971).

### 4.2.2. Hledání sekvencí LEA-like proteinů v transkriptomu *C. costata*

Výsledky DE analýzy dat získaných sekvenováním pomocí Illumina RNAseq z publikace č. 1 neobsahovaly žádnou sekvenci s jasnou anotací LEA (anotace byly generovány pomocí algoritmu Blast2GO (v. 4.1.9, Oracle Corp). Proto jsme se rozhodli dále pátrat po přítomnosti LEA-like sekvencí v publikovaném transkriptomu *C. costata* (Poupardin a kol., 2015).

Ve spolupráci s Michalem J. Wise (Univerzita v Cambridge, UK) byla provedena analýza transkriptomu na přítomnost motivů typických pro LEA3 proteiny pomocí nástroje MAST (Motif Alignment and Search Tool, v. 4.12.0, <http://meme-suite.org>).

Hledané LEA3 motivy:

- KQKAQETKDAAKEKAQETKQYTKQKAQETKDYTKE
- KAQEYKQYAKEKAQETKDYTA
- LQQAGEKVKGAAQGAQKDAVKHTLGMGEDK
- QQSYHAGETKGRTEE
- VLSGIGSSFSSGAAKQSGVGAVGFGRKTELVVVAQRKKS LIYADKGDGNI
- AGEYKDYT

Do MAST LEA3 analýzy byly přidány dvě kontrolní sekvence, které reprezentují dobře charakterizovaný LEA3 protein hlístice *A. avenae* (AavLEA1, Q95V77) a rovněž jeden potenciální LEA-like protein z transkriptomu anhydrobiotického arktického chvostoskoka *Megaphorura arctica* (EW755263\_6). Tyto sekvence se v MAST analýze umístily na 1., resp. na 5. místě podle pravděpodobnosti výskytu LEA3 motivů (Tabulka 2).

Výsledek analýzy naznačil, že v transkriptomu *C. costata* se nacházejí nejméně tři kontigy, na nichž se nachází sekvence s jistou strukturální podobností s proteiny třídy LEA3 a jsou provizorně anotovány v NCBI databázi jako LEA-like proteiny. Dvě sekvence, Seq94289 a Seq56389 vykázaly E-values podobná potenciálnímu LEA-like proteinu *M. arctica*. Další sekvence, Seq110931 sice vykázala mírně nižší hodnotu E-value, avšak měla velmi vysokou podobnost proteinu XP\_023160046.1 octomilky *D. hydei*, který je rovněž anotován jako LEA-like a je uveden na seznamu živočišných LEA3 proteinů (Janis a kol., 2018).

**Tabulka 2: Výsledek MAST LEA3 analýzy.**

Contig ID	E-value 1	Length	BLASTx hit against NCBI nr database or description	NCBI ID	E-value 2
<b>LEA3 protein</b>	<b>3,20E-34</b>	<b>143</b>	<b>control, Aav LEA1, Aphenlenchus avenae</b>	<b>Q95V77</b>	
Seq94289	5,50E-11	78	late embryogenesis abundant protein ECP63 isoform X1 [Lucilia cuprina]	XP_023296260.1	1,17E-07
Seq78873	1,60E-08	159	PREDICTED: uncharacterized protein LOC108108988 [Drosophila eugracilis]	XP_017072735	9,71E-51
Seq113314	1,10E-07	107	none	x	
<b>LEA3 protein</b>	<b>1,50E-07</b>	<b>147</b>	<b>control, putative LEA protein, Megaphorura arctica</b>	<b>EW755263_6</b>	
Seq48648	2,30E-07	108	PREDICTED: plectin [Drosophila bipectinata]	XP_017101757	1,16E-04
Seq56389	3,00E-07	64	late embryogenesis abundant protein ECP63 isoform X2 [Drosophila serrata]	XP_020803064.1	1,15E-07
Seq46613	3,30E-07	80	none	x	
Seq80724	9,70E-07	265	PREDICTED: protein DEK isoform X2 [Drosophila suzukii]	XP_016930271	6,05E-50
Seq80244	1,10E-06	638	X-linked retinitis pigmentosa GTPase regulator [Drosophila guanche]	XP_034132970	2,07E-122
Seq79321	1,20E-06	133	uncharacterized protein Dvir_GJ18720 [Drosophila virilis]	XP_002055561	2,30E-32
Seq76424	1,40E-06	99	dynein heavy chain 10, axonemal [Drosophila willistoni]	XP_002070499	2,04E-11
Seq75154	1,80E-06	40	none	x	
Seq109997	2,40E-06	98	PREDICTED: 2-oxoglutarate dehydrogenase-like, isoform X1 [Drosophila takahashii]	XP_016993913	3,47E-15
Seq55330	2,60E-06	422	PREDICTED: RNA-binding protein 34 [Drosophila arizonae]	XP_017860049	2,86E-114
Seq2783	2,70E-06	85	none	x	
Seq5363	2,70E-06	234	none	x	
Seq60092	4,30E-06	627	aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase isoform X1 [Drosophila willistoni]	XP_023037824	1,36E-139
Seq51164	4,70E-06	109	lipid-binding protein HSP12 [Saccharomyces cerevisiae S288C]	NP_116640	6,29E-71
Seq82382	5,40E-06	587	PREDICTED: sarcalumenin-like, partial [Drosophila suzukii]	XP_016939957	3,06E-31
Seq3494	5,40E-06	815	PREDICTED: titin [Drosophila rhopaloa]	XP_016969498	0
Seq55430	5,70E-06	409	female sterile (1) DNA-binding protein K10 [Drosophila melanogaster]	NP_477491	4,07E-60
Seq581	6,10E-06	658	sarcalumenin isoform X2 [Drosophila willistoni]	XP_002073596	0
Seq57325	6,20E-06	605	PREDICTED: sarcalumenin isoform X5 [Drosophila navojoa]	XP_017967088	1,14E-31
Seq55975	6,70E-06	470	PREDICTED: PHD finger protein rhinoceros isoform X7 [Drosophila kikkawai]	XP_017031423	6,11E-90
Seq10368	9,70E-06	41	none	x	
Seq5069	1,90E-05	380	CoRest, isoform F [Drosophila melanogaster]	NP_001014752	2,91E-133
Seq100986	2,20E-05	159	uncharacterized protein Dsimw501_GD11511 [Drosophila simulans]	XP_002082322	2,67E-49
Seq111022	2,20E-05	101	mucin-1 [Drosophila obscura]	XP_022214745	1,85E-19
Seq113207	3,40E-05	96	none	x	
Seq56782	3,90E-05	60	none	x	
Seq101493	4,20E-05	170	uncharacterized protein LOC6649013 [Drosophila willistoni]	XP_002071016	1,32E-55
Seq110931	5,00E-05	69	late embryogenesis abundant protein ECP63 isoform X2 [Drosophila hydei]	XP_023160046.1	3,71E-42
Seq5115	6,40E-05	243	histone H2B [Glossina fuscipes]	XP_037896941	2,74E-54
Seq46937	6,50E-05	81	none	x	
Seq4275	7,00E-05	169	cytochrome c1 isoform X2 [Drosophila subobscura]	XP_034667138	8,59E-15
Seq53841	7,30E-05	256	myosin heavy chain, skeletal muscle, adult isoform X2 [Drosophila busckii]	XP_017836471	2,72E-35
Seq82838	7,40E-05	151	neurofilament medium polypeptide [Scaptodrosophila lebanonensis]	XP_030369496	2,37E-15
Seq53573	8,80E-05	257	restin homolog [Drosophila subobscura]	XP_034664242	1,10E-36

Tabulka 2 ukazuje pouze výsledky s E-value 1 < 1,00E-05. Čím nižší je hodnota E-value 1 (2. sloupec), tím pravděpodobnější je výskyt motivů typických pro LEA3 proteiny v dané sekvenci. Sekvence jsou seřazeny vzestupně podle E-value 1. Šedá pole: dva kontrolní LEA3 proteiny. Zelená pole: sekvence *C. costata* podobné proteinům s anotací LEA-like v NCBI databázi (míra podobnosti je dána hodnotou E-value 2, poslední sloupec).

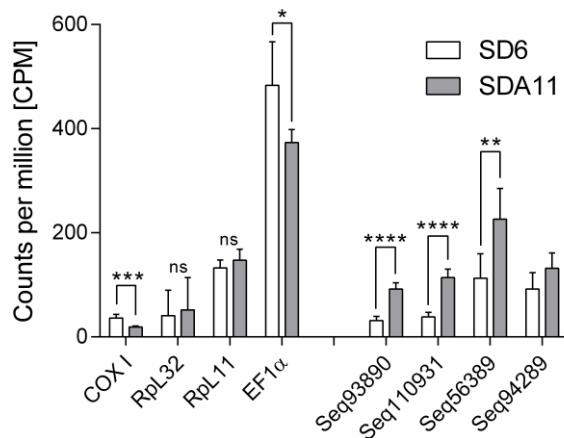
Porovnáním struktury všech tří nalezených sekvencí a jejich BLASTováním proti transkriptomu *C. costata* byla nalezena ještě jedna sekvence, Seq93890, s velmi podobnou strukturou. Všechny čtyři sekvence vykazují značné strukturální podobnosti, což ukazuje Obrázek 10.





#### 4.2.3. Dohledání výsledku pro LEA-like sekvence *C. costata* v RNAseq analýze publikace č.1

Vrátil jsem se k předchozímu RNAseq experimentu a pátral jsem po konkrétním umístění sekvencí Seq94289, Seq56389, Seq110931 a Seq93890 ve výsledcích DE analýz. Zjistil jsem, že v publikované verzi výsledků jsme použili příliš přísný arbitrární práh pro filtrování signifikantních výsledků. Po snížení prahu z hodnoty *4-fold* na *2-fold difference* byly tři sekvence shledány jako upregulované u SDA11 larev oproti SD6 larvám s těmito rozdíly: 2,97-fold (Seq110931); 2,94-fold (Seq93890); 2,00-fold (Seq56389). Čtvrtá sekvence (Seq94289) byla rovněž upregulována u SDA larev, ale pouze 1,44-fold (Obr. 11).



**Obr. 11. Upregulace LEA-like sekvencí *C. costata* v RNAseq analýze z publikace č. 1.** Obrázek ukazuje výskyty „readů“ (Counts per million) v RNAseq databázi pro sekvence kódující čtyři vybrané referenční proteiny (COX 1, Rpl32, Rpl11 a EF1α) a pro sekvence kódující potenciální LEA-like proteiny. Sloupce jsou průměry ± SD analýzy tří cDNA knihoven pro každý fenotyp (SD6 nebo SDA11).

Dále je z Obr. 11 patrný fakt, že transkripty pro LEA-like sekvence *C. costata* byly v RNAseq databázi velmi časté. Četnost výskytu jejich „readů“ byla podobná jako četnost výskytu u čtyř vybraných referenčních transkriptů (dva různé ribozomální proteiny, elongační faktor, cytochrom c oxidáza), které jsou všeobecně považovány za velmi časté.

#### 4.2.4. Ověření sekvencí LEA-like kontigů *C. costata*

Alignment všech čtyř sekvencí (Obr. 10) ukázal na jejich vzájemnou strukturní podobnost. Provedl jsem extenzivní ověřovací sekvenování (Eurofins) PCR produktů (včetně 3' a 5'-RACE) z cDNA templátu *C. costata* pro všechny čtyři sekvence. Použití cDNA templátu však činilo velké potíže a stále jsem si nebyl jist, zdali jsou sekvence čtyř kontigů unikátní (zdali každá kóduje vlastní protein na jiném místě genomu) nebo jestli jde pouze o redundantní sekvence uměle vytvořené při skládání transkriptómu z jednotlivých RNAseq „readů“ pomocí nástroje SOAP (Poupardin a kol., 2015). V roce 2020 byla sekvenována genomová DNA *C. costata* pomocí metody Oxford Nanopore Sequencing (Kim a kol., 2021), což mi umožnilo poměrně rychle práci dokončit. Genomovým sekvenováním bylo získáno celkem 815 kontigů o celkové délce 315 185 165 bp, což pokrývá téměř celý genom o odhadované velikosti 350 Mb. Nejdelší kontig měl více než 35 Mb a další tři kontigy měly každý více než 20 Mb. Výsledkem dalšího kola sekvenování PCR produktů, tentokrát z templátu gDNA, a porovnáním výsledků s publikovaným genomem *C. costata*, jsem nakonec získal kompletní a

ověřenou sekvenci lokusu *Ccos LEA3-like* genu, který obsahuje kromě genu *Ccos LEA3-like* také jednu další nefunkční kopii (pseudogen) tohoto genu:

### Genomový lokus *Ccos LEA3-like* proteinu:

kontig380, báze 4 223 408 – 4 229 234 (5 827 bp) (Kim a kol., 2021).

```
TTAAAGTTTGAATGATGTGCTTTAAATTGCTTGCCGCACAGCTGACATCATGGCAAGTGCTTAGCAAT
TTTTAGGCGCCCCACATTGGGCGCCAGTAGTAACATAAGAATTCTGCATTCTGTGCGTATTTAATGA
AGCATGGCATGTAATAAGCTTGAAATAGTTACGGCTATGATAATTATAAGTTTGTGGTTTTCTTT
GGGTTATAAATATTGCTCAAGCATAATACGAGCTAATTAGACGTAGAGGGTGTAGAGTACACAGATAA
GAAGCAGCTAGGTACACATATATATATTATATATTCTTCAGTTGCGTTTATAAATAGCTGCGAAATTTGC
AATCACAGCACAGTTTCACTTGAAAAGTACATACGAAATGGACGCTATCCAATGTAAGGTCTTAACAA
TTATTAACCTGAAGTTTTCTAACAAGCTCTTATCTGTGCTCTCTCTAATTTGAATTATATATAAATAT
ATATACGTATAGCTATATATTCTTAAGCTGCGTTTATAAATTCGGCATAGTTTGCAAACAAGGCACA
GTTGCATTTGACAAATCTAAACGAAATGTTTCTTCCAAAATAAGCTTTTAATAATTAGCTTGTTCCTTAT
CTGTGCTTTTCTACAGCCTCACTCAAGAGCGTGGGCGACAAGACTGCCAGCTTGTTTCAGCAAAAAGAAG
GACGAAACCGAGAATCTGGCTAGTGAACAGCTAGCGACGTAAAAAATTTTACCGAGGACACATCCAA
AAAAGTGGGTGAGTCACTGCACCAGACTAAAGAAGAGGCCGAGAACGCAGGTTAGTTTAGTTAGCTGC
ATGAGCTTAACATAAACATAAAAAATCAATCATTTTTGTTCTATAGCCAAAGAAGCTGCTGCATTTGCTA
AAGCTGAGGCTCAAAGGCAGGCAATGCTATTGATTCCGGCGTCAATTCAACTAAAGATGCCCTAGGC
TCTGGCGTGCAACACACCAAGGACGCCGTAGGTTCTGGTGTGCAACACACCAAGGATGCGGCAGCTAA
TGTGGCAAATGCTTCAACGCGTGTGCCGAAAATGCTGTAGATTCCACCAAGAAGGCTGCAAGTGATG
CCTACAATAAAAGCGTAAATGTTACCGATCAGAAGCTTAGGGAAGCCGGAGGCGCTATTGATGGAGCC
ATGAAGCAGACCAGCAATACTGTGGGCGAAAAGCTAAGTGATGCCAACAAAGTATGTGGGTCAAAGTA
TGAAGGTCTGGAGAAGGGCGTGCATGACGCTGCAACCAGTGTGCACGATACTGTCCGAGAGCAGACAT
CTAATGTTTTGGGCAAGATGAACTTGAAGTGAATCTAGTTTTTTGTTGAGTTAATATGAATCTCCAGT
TAAAATCATAAATAAAACCCAGGAAAAAAATCGAATATAAAAAATTTTCAATGTAATTAACCAACTA
TATATGCTTTTTTTTTAATAATACACAAATGAAAACAATAGAAAAGTCTTCAATGTAACAAGTGCCAG
AAATATGAGTGCAAAATGTTAATTGATTGAGGATATATATATATATTTTTAAAAAATATATTTATATATA
TATTTTTTTTTGTGAAAACTATTATTTTTTATATGCAGCGCAGCTTTTACTATAAGCACATTTCTCTAG
TACACAAACATGTGTATGTTACAAAAGTCAAGAATCTTAAAAAGAAAAAATTTGGTACCTTTGAGGC
ATTTGATTGTACCTAAAAAACATAAAACGAACGAAAGAAAAATAAAAAATATATAAGTTAAATGTTAT
ATTCAGTTTTTATGTAGTAATGTACGTTTTAAGTAATTTAAACTTTTTGCACAATAAATACAAGTGTGTT
TTTAATAAATAATTTATAATCTGATTGTTACTATACATACTAAATGTGGTAATATTTAAATTTAGA
TGTTTAGTTGCATACTGATGCGTAATATTTTTAATTGGCTACAAAATGTTGATCAGCAGCGAATCACA
GCTGAGAGCAGACCAGAAAGATAAACGAAAGGTACACGAAGCCGAAGCAAACCGAAGTCATCAGAGAG
AGAGCTCGGTTCAACTCAACACTGGCTTTGTACGATGTCTGCACCTGAGAGAAATAAATGATTAAATGC
GTCGCTTTGGCCAGTTGTCAAAATGATACAAATATATTTTTAATATTGGCAATCAACGCGTATTATTAT
TTTTAAAAACAACTAAATACAATATCAAAATGTCATAAAAAATGTCATGCAATGTTCTGAACTTTGAA
CATAATATATATATCAACTTTAATAAATATGAAACAATGAAATTTATTTTGACAGTCTATATTAATTA
TAATTATAACAATTTAAGATGCAAATAATAAATACGATGAATATGGAAAATAATGCAGCAACATTT
TGCAACGCAATTCATTTGCGCAATGTATAGCTCACTTATAGCCTATTTACACTGGGGCATATCTAACT
TCTGACGTCAAATGTAAAAGATGTTGGATAAGAATTTGCTGTTCTGAAAATTTCAACATCATTTCCAC
ATATTCGAAACAAGGCGCCAGAATCTCATATGTTTATGGAAGTACGACACAATTTAGGAAGTATAGAT
AACAAAAATGTACAAAGCGATTTCAGCAAGCATTCCAGTCGGAGCTTCTAGTTTGAATGCGGAAAAAA
GTAGAAACCACAAAACTTATTGTTTTTGTCTTTATACAAGACGTTTTAAAAAATAAATAAATAGT
AAAGTTTCGTTTGTTCGAACTCCGGCTGAGAGCTGTACGAAAAGTGTGTGCTTTGACTAAAATAAA
TTTGGACTAACATATTAGCTAGTTCTTGTCCGCTTGAATTTGCAGTATTACAGATAGATGGCGCTAA
CTTGCTGCTGTTAAAATTTGTGTCTGTGCTAAGCTGGTGTCTGCATAACAACCGTAAGGTGGCGCTGA
TGTGCTTGTGAGTTGAATAAGTTCCGCTTATTTGAATAGATGGCGCATTTCTGACGACTTTGCAACAA
```

CTAACATAGCTGGCGCTGCTGTGCAGTTTCCGTCTAAGCTAAGCTTGCGTTTTACTAATAATAGCTGG  
CGCTAAAGTGCTTTACAGTGTATTTCACTTTAGCAGCCTTCATATTGTAATTTTAATAAGAAATTA  
AGCGGTCAAATTTTTATTGAAAAAAATTCACGTGCAGTAAAAGCACGCGTTAGAAGTAAACTTTT  
CGCCCAACTTATTTTTTCGACGCTGTTTTTATTTCCCTTAGTTTAGCCGTCTGAACATTACTTTGGAGTT  
CAAACGGTGTCCTAACAATCAATTATTATAATAATTATGAAAGTGAAGGAACGTGGAAAATATCTTTA  
AACATCACTTTTACTCTTATTTATCGCCTTACCTCTGCCTACGCAAAGTAGTGCGAATAGAACAAAAT  
CAATAGTAATTCCTCTGCGATGAGCGCGTAAGAAAGCAGCATAAAATGAAATAGAGAAAGAGCTAAAC  
AATGTAACGTGTCGCGCAATGCTGCTTGGCTTTGTTGTTCTGTGCAACTCTCACCTCCCCCGCGCAACT  
TCAACATCATTCTTTGCGCAACGCGATCTTATTTTGTAGCCAACCACCACCAAGGCCACGGCATTGCC  
GTGAGAGTAACAAAAGTGAATGAGAGAGAGAGAAGCAAACAAAATACGAGCTGGCACACAAGCTAA  
TGCATGCACACTGGCACTTGTATGTATGTATGTATGTATGTATGTATGTATGTATGTATGTATGTATGT  
CGAAAACAATTTCTTTTCGTTTTACACACATACACACATGTGCTGCGTGCTTTAGCTGACCAGCCGCGGCC  
GCTTTACTCCCCTCTCTTTATCATGACCACGGTTCCTCTCTCAACAAGAGACGAAGTCATGACTCAT  
GACCACCAACATAACGTCAGCGTCCAATGCGAAAGAGAAAATCAAAGCAGCTAACGTTTTTTTCGTT  
TAACAAAATTTCAAAGTTACTCCCATAGAAATTCACATTTCGTTTCATTCACTCATTATTTCATTACGCA  
TTGTTTTTCATGCCCAAAAATGCACAATGCCCAACAATGCCCAACAATGCCCAAAAATGCACAATGCCCA  
ACAATGCCCAAAAATGCACAATGCCCCCTAAAAAGTTTTACTCCAAAATTTCAAATCTTCTATTGTAA  
CTTAATAAGAACTAAAACATTGATACTCTTTAAACGAAGAAAATAGAAACTGTCTAGGCCAGCTTATG  
CCGTCTGTCAACCAACCCATGCTATCAGCCACAAGTACCACAGTACAACAACTCATGCTCGAAAATA  
TTGGTTTTTAGTTTTGTATATTTTTTTTTTGTAGCTTCTGCGCATTAAGTGCCTTCAAACAACAACAG  
CTGGAAAGATGTGTCATTGTATGCGTATGTTTTATTGCGTAACTTTTTGGATATTCACACACACACACA  
CACACGTACGCACACAATTAGCGCTTCAGCCGGTTTTGCTGACGTTTTCTAGTTTTGTGAAATATGTATC  
TCTTTTCGCTCAGTACGCTTTATAAACCGCATTGTCTTTGCCTGGCTTATTATATTGACCCCAACATGA  
CAAAGCGAAGCTTTAGCTTCTATTTGTATCTTTGTACGTACGAGTAAAGCAAATAACAACTAATCTA  
TATGCATCAATTTAGAAGCCATAAGTCAAAGCAGGCCAGAACTGCTACATATAAGTTGCATACACTA  
TTTTGTTTTAACCTACACTAATGCAATTTTACGGCGTCAACATGATAGATAGCATTTTTGCTCATTAGAT  
TGCTTGCTCATTGAACTTTTTCCACAAAAACAATTTATGTAGATAGACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAC  
ACTTTTTGTTTTGTGCTTTGAGTACAATATTCCAAATGTAAACAATTTGCTGCGTTTTATAAATAGCTG  
CGAAATTTGCAGTCAGAGCACAGTTTTCACTTGACAAATCCATACGAAATGGACGCTATCCAATGTAAG  
GATTTAACAATTATTAACCTGAAGATTTCTAATAAGCTTGTCTTATCTGTGCTCTCAAATTTTAATT  
ATATATACTTATATATTGTTAAGCTGCGTCAAGGCACAGTTGCATTGACAAATCTATAACGAAATATA  
AGCTTTTAATAATTAGCTTGTCTTATCTGTGCTCTCTACAGCCTCACTCAAGAACGTAGGCGACAAG  
ACTGCCAACTTGTTCAGCAAAAAGAAGGACGAAACCGAGAATCTGGCTAGTGAACAGCTAGCGACGT  
AAAAGATTTTACCGAGGATAAAAACCAAAAAGTGGGTGAGGCTTATGACCAGGCCAAAGAAGGAGCCA  
AGGACGCAGGTAGTTTTATTTACCTGCTTGGGCTTACCATAAACCATACAGACATCTAATGTTTTTGGG  
CAAGATGAACTTGAAGTGAATCTAGTGTTTTTGTTGAGTTAATATGAATCTCCAGTAAAAATCATAAAC  
TAAAAATCCCAGAAAAAAAACGAATATAAAAATTTCTCAATGTAACATAACCAACTATATATGCTTTTTT  
TTAATAATACACAAGTGAACAATAGAAAAGTCTCAATGTAACAAGTGCCAGAAATATGAGTGCA  
AAATGTTAATTGATTGAGATATATATATATATTTAAAAAATATATTTATATATATATTTTTTTTTTGTG  
AAAACTATTATGTTTTATATGCAGCGCAGCTTTTACTATAAGCACATTCTAGTAGACAAACATGTGT  
ATGTTATAAAATTTCAAAAACCTTTAAAAAATAAAATTTGTTACCTTGAGGCATTTGATTGTACCT  
AAAAAACATAAAAACGAACGTAAGAAAATAAACACATAAAAGTTAA

Šedivě je vyznačena kódující sekvence *Ccos* *LEA3-like* genu přerušená intronem o délce 62 bp. Žlutě je vyznačena sekvence pravděpodobného pseudogenu.

## Ccos LEA3-like protein

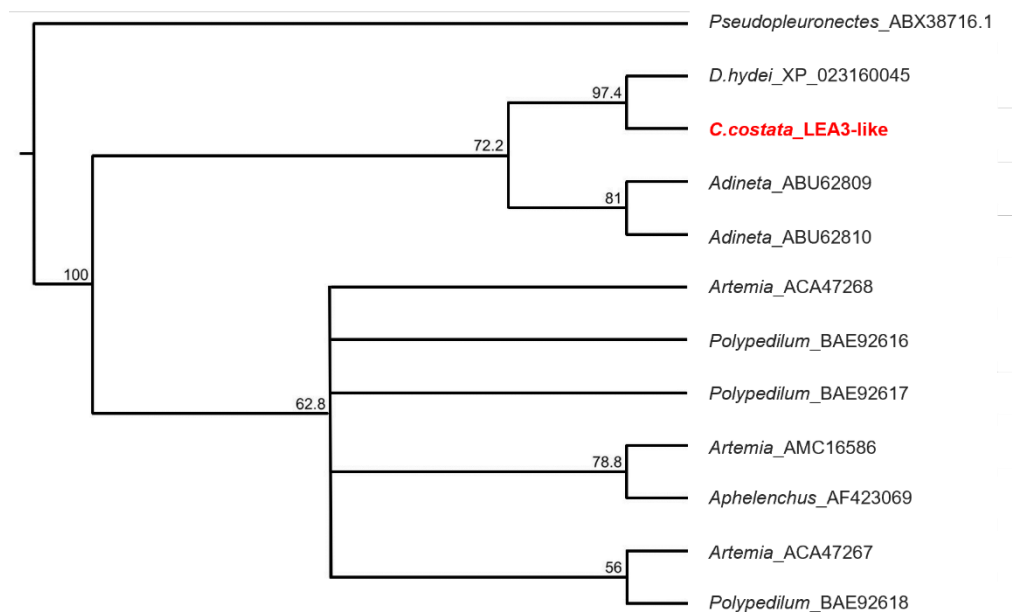
MW = 23.970 kDa

MFFQNKLLIIISLFLSVLSTASLKSVDKDTASLFSKPKDETENLASETASDVKNFTEDTSSKKVGGQSLHQ  
TKEEAENAAKEAAAFKAEAQKAGNAIDSGVNSTKDALGSGVQHTKDAVSGVQHTKDAAANVANAST  
RAAGNAVDSTKKAASDAYNKSVMVTDQKLREAGGAIDGAMKQTSNTVGEKLS DANKYVVGQKYEGLEKG  
VHDAATSVHDTVGEQTSNVLGKMNLK\*

Šedivě označený 5'-konec sekvence je lokalizační signál SP (*Secretory Pathway*) detekovaný pomocí nástrojů TargetP 2.0 (pravděpodobnost výskytu: 0,9852) a SignalP-5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>) (pravděpodobnost výskytu: 0,9147).

### 4.2.5. Podobnost Ccos LEA3-like proteinu ostatním živočišným LEA3 proteinům

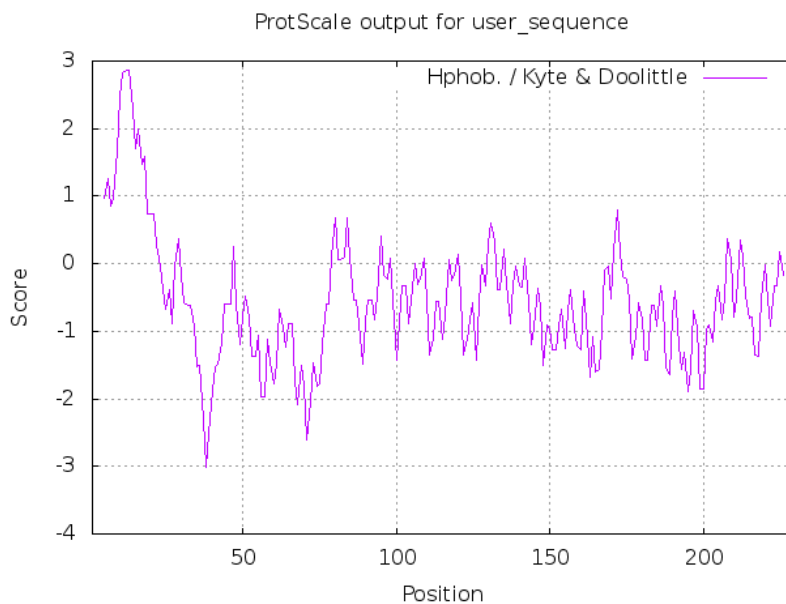
Provedl jsem porovnání struktur Ccos LEA3-like proteinu s 11 různými živočišnými LEA3 proteiny (Janis a kol., 2018) pomocí nástroje ClustalW v softwaru Geneious. Výsledek ukazuje, že protein Ccos LEA3-like se nijak nevymyká z rodiny dalších živočišných LEA3 proteinů (Obr. 12). Dále výsledek potvrzuje to, co je o LEA proteinech všeobecně známo, a to že jejich primární struktury vykazují relativně nízkou frekvenci shod a podobností (Obr. 13). Nicméně,



**Obr. 12. Strom živočišných LEA-like proteinů.** Porovnání bylo provedeno pomocí nástroje Neighbour-joining consensus tree (Saitou and Nei, 1987) v softwaru Geneious. Čísla u jednotlivých uzlů značí bootstrapové hodnoty. Jako outlier zde byl použitý antifreeze protein platýze rodu *Pseudopleuronectes*.



Hydropatický plot (<https://web.expasy.org/protscale/>) (Obr. 14) ukazuje, že kromě signálního peptidu (20aa), je celá struktura Ccos LEA3-like proteinu převážně hydrofilní, což je pro LEA proteiny typické (porovnej s obrázkem 3 v kap. 2.1.7.2.).



**Obr. 14. Hydropatický plot Ccos LEA3-like proteinu.** Plot byl zkonstruován metodou podle Kyte a Doolittle (1982) (<https://web.expasy.org/protscale/>)

#### 4.2.6. 3D struktura Ccos LEA3-like proteinu

Pro odhad pravděpodobné 3D struktury Ccos LEA3-like proteinu jsem použil několik nástrojů. Obrázek 15A ukazuje výsledek analýzy nástrojem PredictProtein (<https://predictprotein.org/>). Podle tohoto nástroje je predikován signální peptid o délce 20 aa. Zbytek sekvence tvoří  $\alpha$ -šroubovici, kde se pravidelně střídají regiony exponované a vnitřní. Většina sekvence je rovněž predikována jako neuspořádaná (disordered), což znamená strukturní flexibilitu a absenci pevné, jasně uspořádané trojrozměrné struktury, s převážně vysokým relativním B-value (počítaný nástrojem PROFbal ([https://www.rostlab.org/papers/2006\\_bioinf\\_profbal/paper.html](https://www.rostlab.org/papers/2006_bioinf_profbal/paper.html))). Vysoké hodnoty B-value značí flexibilní exponovaná residua. Pro srovnání uvádím na Obrázku 15B výsledek analýzy nástrojem PredictProtein pro typický LEA3 protein, pro AavLEA1 (AAL18843). Také zde vidíme strukturu  $\alpha$ -šroubovice a vysokou pravděpodobnost toho, že je protein neuspořádaný.

Dále jsem použil nástroje PSIPRED a DISOPRED3 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), které slouží specificky k hledání strukturně flexibilních regionů (disordered). Výsledek je uveden na Obrázku 16A: Pro protein Ccos LEA3-like je predikovaná struktura  $\alpha$ -šroubovice (horní část Obr. 16A). Oba konce proteinu jsou predikovány jako neuspořádané s možností vazby na proteiny, a další krátký neuspořádaný region se nachází ve středu sekvence (střední část Obr. 16A). DISOPRED3 Plot (spodní část Obr. 16A) uvádí výsledek graficky: vidíme dva silně neuspořádané regiony na obou koncích proteinu a dále dva krátké úseky ve středu sekvence, které rovněž dosahují hodnot typických pro neuspořádané proteiny. Pro srovnání uvádím na obrázku 16B výsledek analýzy nástrojem PredictProtein pro typický LEA3 protein, pro AavLEA1 (AAL18843) – vidíme velmi podobný výsledek, jako pro protein Ccos LEA3-like.

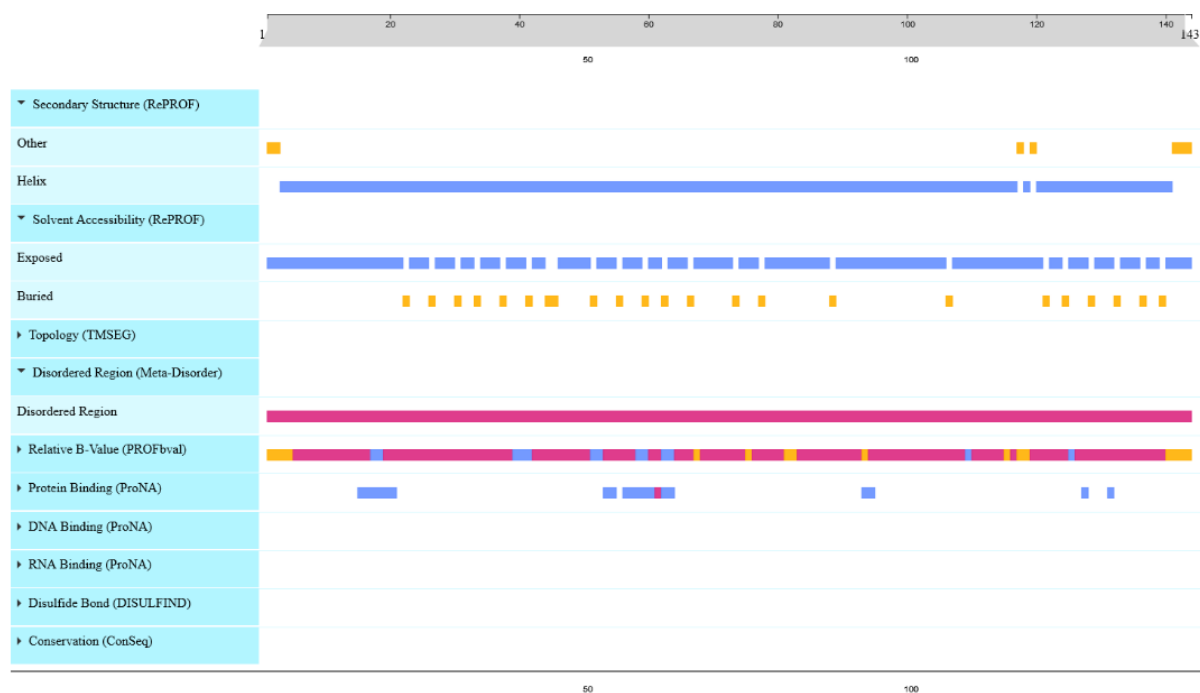
Nakonec jsem použil nástroj I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>), který odhaduje 3D strukturu proteinu na základě tréninku neuronální sítě na již známých, publikovaných 3D strukturách proteinů. Také tento nástroj jasně predikuje strukturu proteinu Ccos LEA3-like jako  $\alpha$ -šroubovici (horní část Obr. 17A). Na spodní části Obrázku 17A pak vidíme pět nejlepších možných 3D modelů proteinu Ccos LEA3-like. Opět, pro srovnání uvádím na Obrázku 17B výsledek analýzy nástrojem I-TASSER pro typický LEA3 protein, pro AavLEA1 (AAL18843) – vidíme velmi opět podobný výsledek, jako pro protein Ccos LEA3-like.

**Predicted Features**



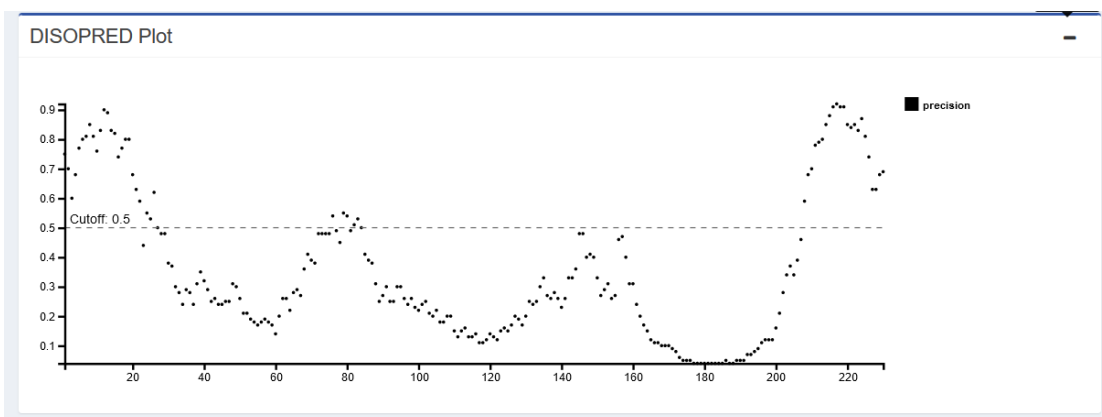
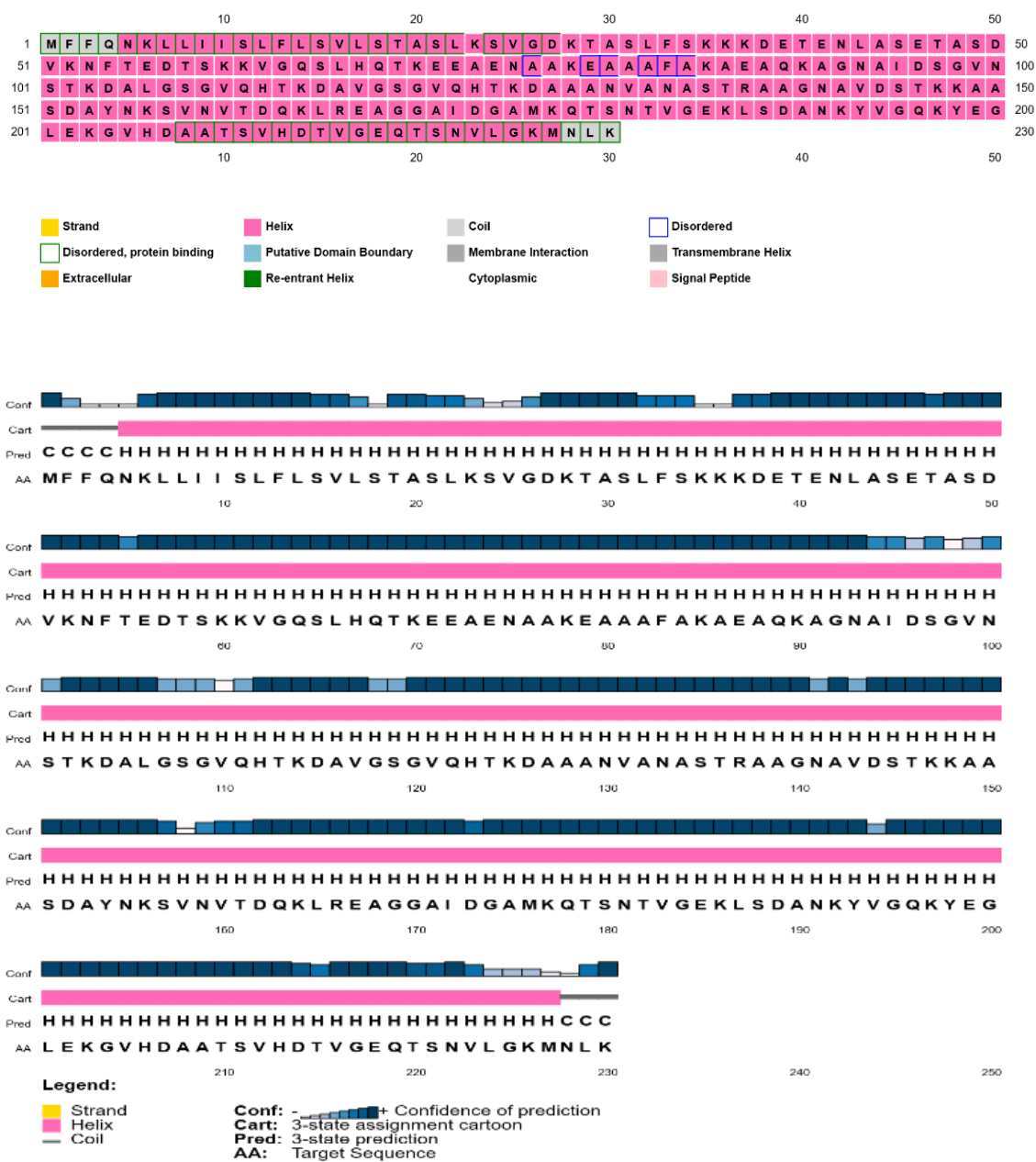
**Obr. 15A.** Výsledek analýzy Ccos LEA3-like proteinu pomocí nástroje PredictProtein.

**Predicted Features**

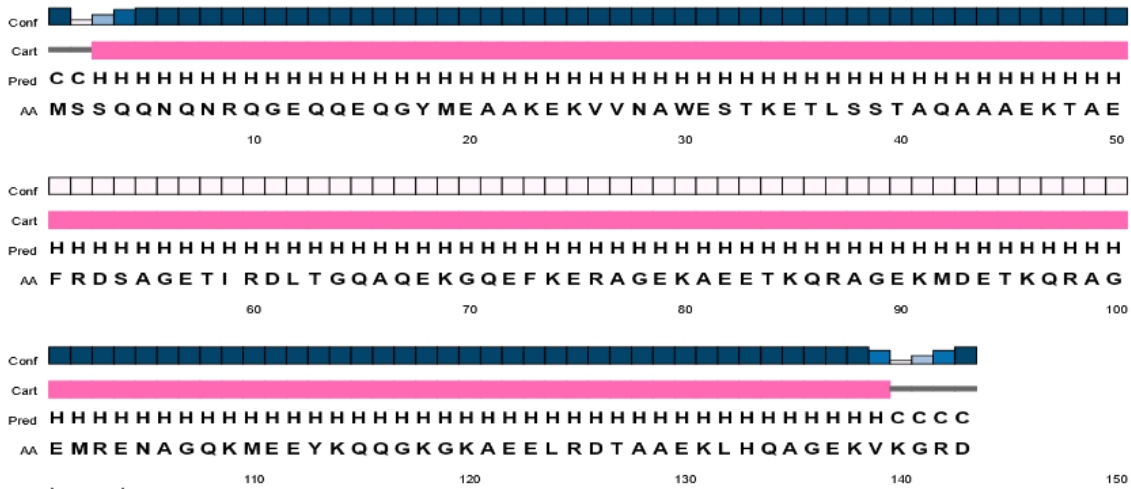


**Obr. 15B.** Výsledek analýzy AavLEA1 proteinu pomocí nástroje PredictProtein.

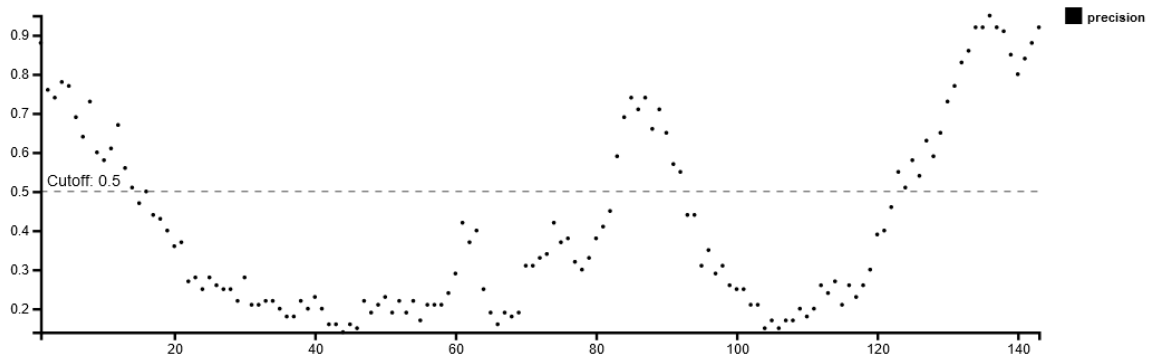




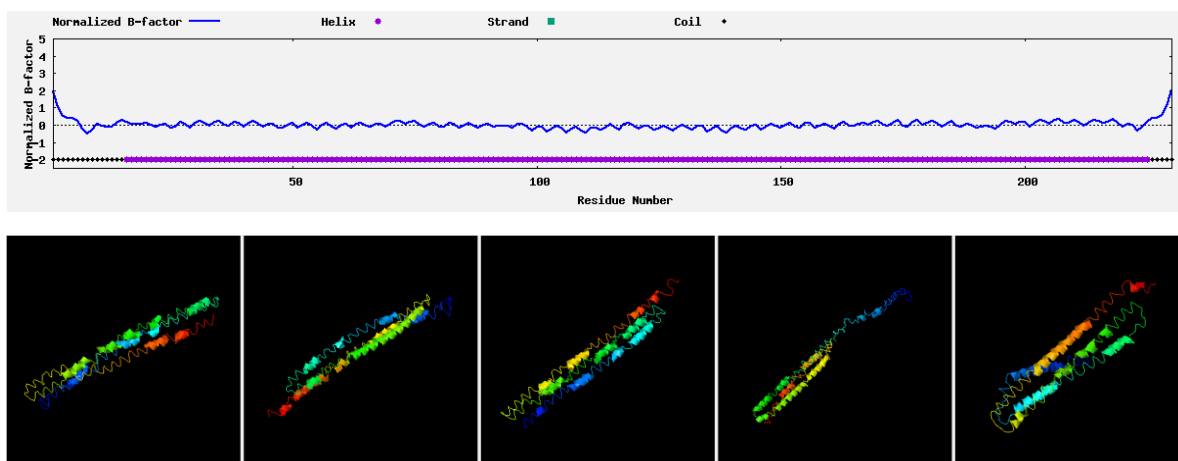
Obr. 16A: Výsledek analýzy Ccos LEA3-like proteinu pomocí nástrojů PSIPRED a DISOPRED3.



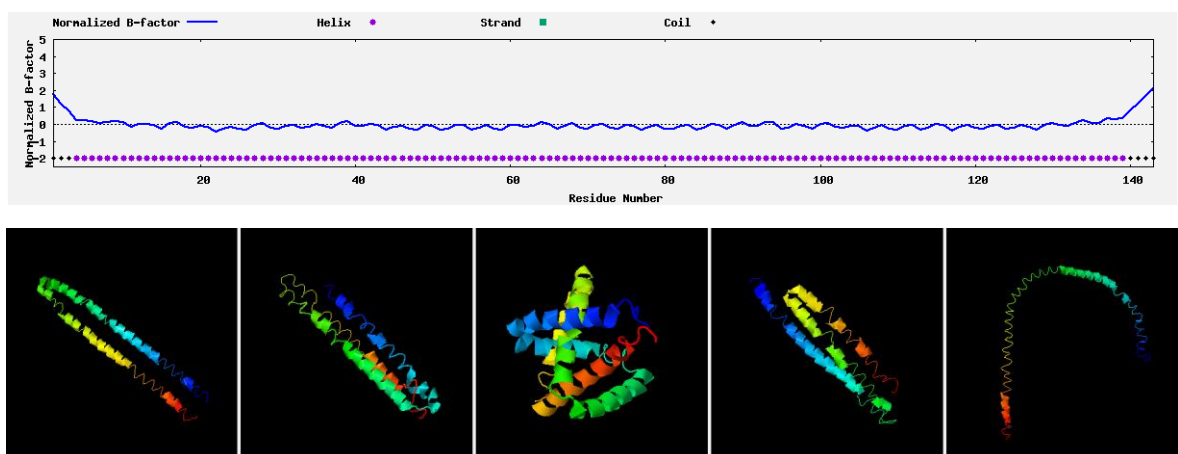
DISOPRED Plot



Obr. 16B: Výsledek analýzy AavLEA1 proteinu pomocí nástrojů PSIPRED a DISOPRED3.

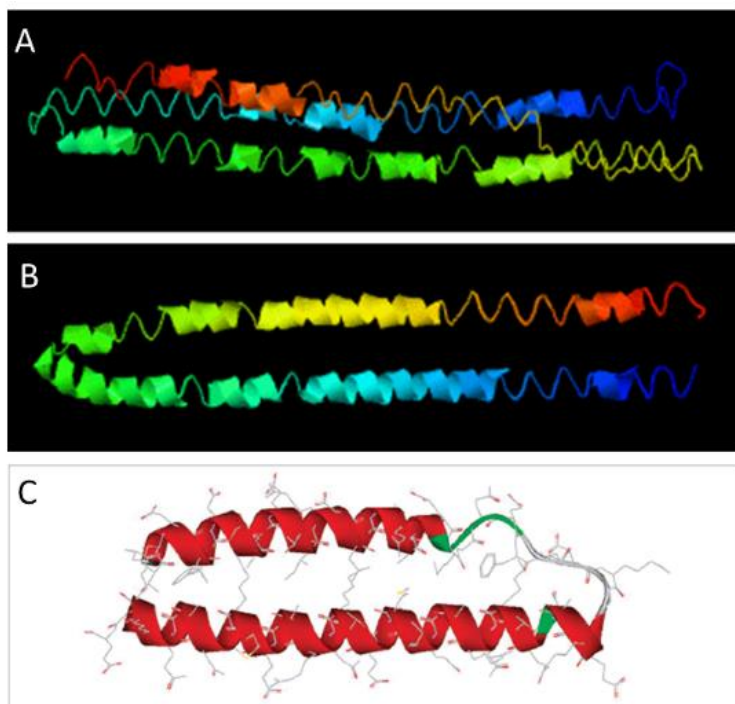


Obr. 17A. Predikce struktury proteinu Ccos LEA3-like pomocí nástroje I-TASSER.

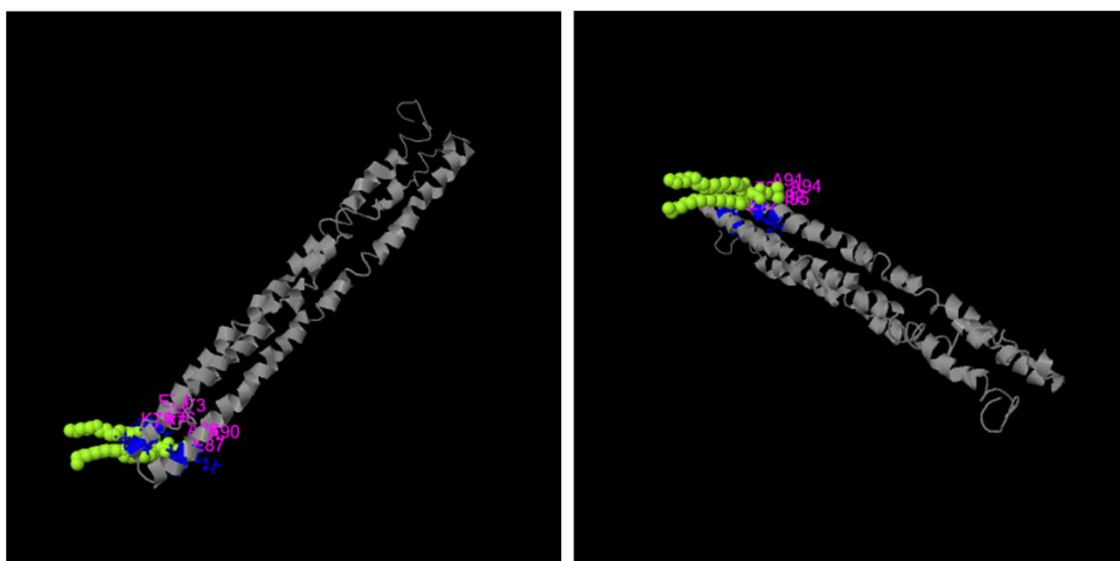


Obr. 17B. Predikce struktury proteinu AavLEA1 pomocí nástroje I-TASSER.

Na Obrázku 18 je finální porovnání struktur proteinů Ccos LEA-like 3 a AavLEA1, včetně originálního modelu, který publikovali Li a He (2009). Jejich model byl vytvořen nástrojem CPHmodels 2.0 (Technical University of Denmark). Vidíme, že nástroje I-TASSER a CPHmodels 2.0 došli v zásadě ke shodnému výsledku – dvě  $\alpha$ -šroubovice spojené krátkým linkerem. Modely predikují strukturu, kterou zaujímají proteiny ve vakuu. Hydratací ovšem LEA proteiny tuto strukturu ztrácejí a stávají se neuspořádanými – což bylo modelováno právě na příkladu proteinu AavLEA1 (viz Obr. 2). Je tedy možné, že i protein Ccos LEA3-like, který byl všemi použitými přístupy shledán velmi podobným proteinu AavLEA1, může být ve vodném prostředí nestrukturovaný, což je charakteristický rys LEA3 proteinů. Dále software I-TASSER predikuje, že Ccos LE3-like protein se může vázat na fosfolipidy biologických membrán (Obr. 19).



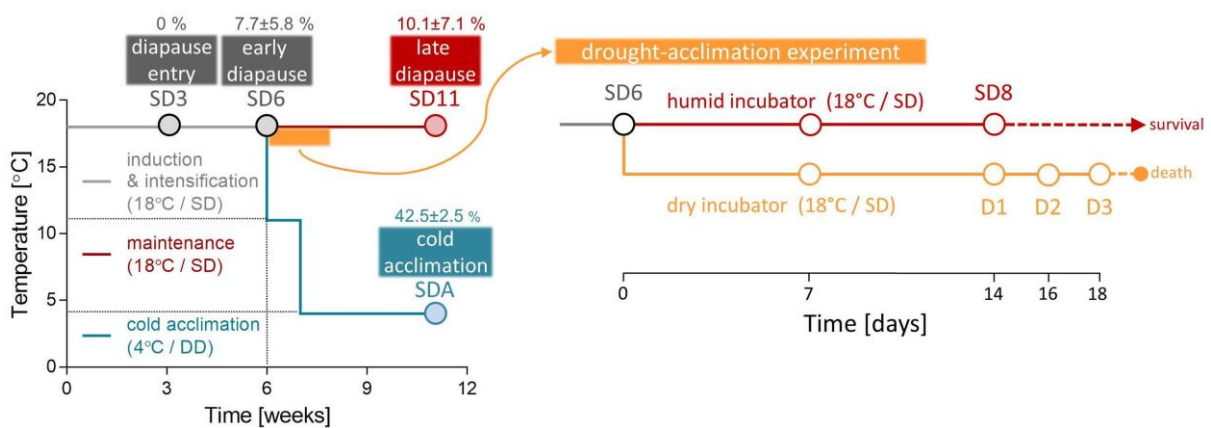
Obr. 18. Srovnání struktur proteinu Ccos LEA3-like (A, I-TASSER) a AavLEA1 (B, I-TASSER; C, CPHmodels 2.0). Panel C je upraven podle Li a He (2009).



Obr. 19. Predikovaná vazba proteinu Ccos LEA3-like na fosfolipidy (I-TASSER).

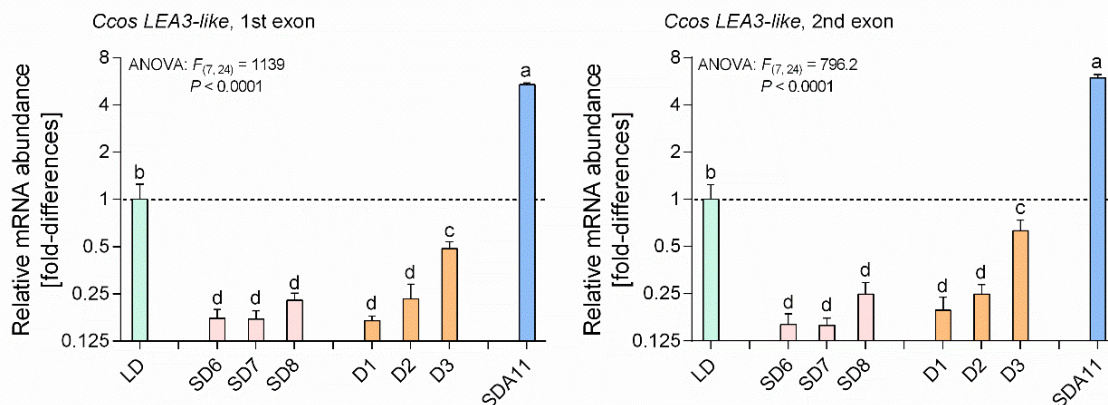
#### 4.2.7. Expresní profil *Ccos LEA3-like* genu v larvách *C. costata*

Provedl jsem analýzu exprese (relativní četnosti mRNA transkriptů) genu *Ccos LEA3-like* v různě aklimovaných larvách *C. costata* pomocí techniky qRT-PCR. Technické detaily metody jsou popsány v publikaci č. 1. Vzorky různě aklimovaných larev pocházely ze dvou studií. Vzorky LD a SDA11 pocházely ze studie uveřejněné v publikaci č. 1 a vzorky SD6, SD7, SD8, D1, D2 a D3 byly odebírány paralelně se vzorky na metabolomickou analýzu uveřejněnou v publikaci č. 2. Z této publikace rovněž přebírám schéma experimentu (Obr. 20). Larvy fenotypů D1, D2 a D3 byly vystaveny suchu – tedy úbytku vody v jejich polo-tekuté dietě. Podrobnější údaje k tomuto experimentu jsou uvedeny v následující kapitole 4.3. (Publikace č. 2).



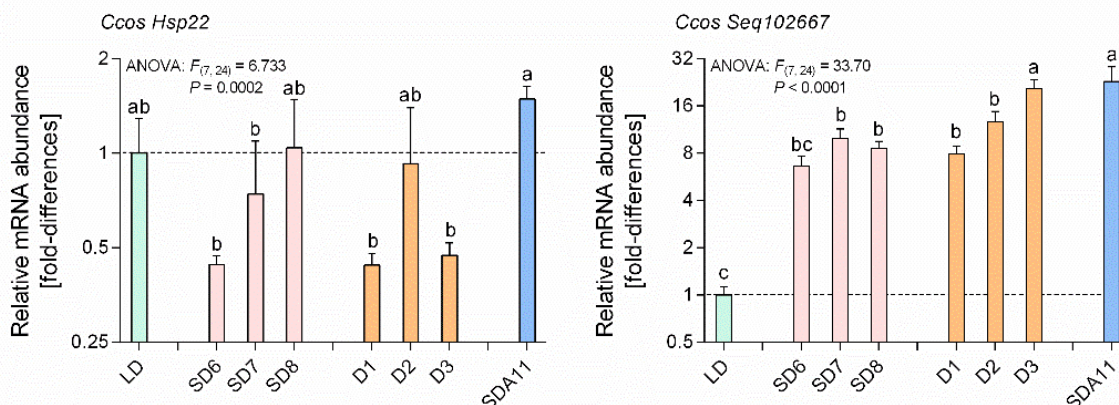
**Obr. 20.** Schéma experimentu pro ověření expresního profilu genu *Ccos LEA3-like*. Obrázek je převzat z publikace č. 2 (Hůla a kol., 2022; Fig. 1).

Očekávali jsme, že gen *Ccos LEA3-like* by mohl být upregulován jednak u larev vystavených suchu (evaporační dehydratace) a také u larev, které procházejí aklimací v chladu (v přípravě na budoucí mrazovou dehydrataci). Odebíral jsem larvy příslušných fenotypů ve 4 opakováních (5 larev v každém opakování), izoloval jsem celkovou RNA, ošetřil ji DNázou a připravil cDNA pomocí Superscript III (Invitrogen) reverzní transkriptázy. cDNA templát jsem potom využil pro kvantitativní qPCR reakci. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku 21.



**Obr. 21. Výsledek qRT-PCR analýzy expresního profilu genu *Ccos LEA3-like*.** Sloupce ukazují relativní expresi v daném fenotypu (exprese u fenotypu LD je arbitrárně položena = 1, exprese u ostatních fenotypů je uvedena jako fold-difference od fenotypu LD). Každý sloupec je průměr ze čtyř nezávislých opakování ( $\pm$  SD). Exprese cílového genu byla normalizována proti expresi 4 různých referenčních genů (Rpl32, RpL19, beta-Tubulin, RpS27A).

Použil jsem dvě různé sady oligonukleotidových primerů PCR reakce: pro 1. exon genu *Ccos LEA3like*, fw: TCACTCAAGAGCGTGGGC; rev: GTCTGGTGCAGTGACTION; a pro 2. exon, fw: TGCTATTGATTCCGGCGTCA; rev: TTGCAGCCTTCTTGGTGGAA. Na Obrázku 21 vidíme, že oba páry primerů dávaly v zásadě shodný výsledek, což naznačuje, že oba exony genu *Ccos LEA3-like* jsou ve všech fenotypech exprimovány současně. Dále vidíme, že exprese genu *Ccos LEA3-like* je výrazně slabší (zhruba 10-krát) u časně diapauzních larev (SD6) oproti aktivním larvám (LD). Během udržování diapauzy ve vlhku za relativně vysoké teploty (18°C; SD6, SD7, SD8) se exprese genu významně neměnila, zatímco aklimace diapauzních larev v suchu (18°C; D1, D2, D3) vedla k signifikantnímu nárůstu četnosti mRNA transkriptů pro *Ccos LEA3-like* (5-7-krát vyšší exprese u D3 larev než u SD6 larev). Nejvyšší nárůst exprese genu *Ccos LEA3-like* byl však pozorován po aklimaci v chladu (4°C; SDA11) (5-krát vyšší exprese u SDA11 larev než u LD larev; a téměř 50-krát vyšší než u SD6 larev). Zároveň jsem provedl obdobný experiment také pro dva další kandidátní geny, které vzešly z publikace č. 1. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku 22.



**Obr. 22. Výsledek qRT-PCR analýzy expresních profilů genů *Ccos Hsp22* a *Ccos Seq102667*.** Sloupce ukazují relativní expresi v daném fenotypu (exprese u fenotypu LD je arbitrárně položena = 1, exprese u ostatních fenotypů je uvedena jako fold-difference od fenotypu LD). Každý sloupec je průměr ze čtyř nezávislých opakování ( $\pm$  SD). Exprese cílového genu byla normalizována proti expresi 4 různých referenčních genů (Rpl32, Rpl19, beta-Tubulin, RpS27A).

Použil jsem tyto oligonukleotidové primery PCR reakce: pro *Ccos Hsp22*, fw: CTTTCGCGA CCCCTTTTGGA; rev: GTCTGGTGCAGTACTGACC; pro *Ccos Seq102667*, fw: ACCGT CTATTGCCGCACTTG; rev: ATTGTTGTTCTGCCAGCGT. Na Obrázku 22 vidíme, že exprese genu *Ccos Hsp22* je relativně stabilní v různých fenotypech. Potvrdil se jak mírný pokles exprese se vstupem do diapauzy, tak mírný nárůst exprese u larev aklimovaných v chladu (porovnej s výsledky na Obrázku 7B). Aklimace larev v suchu neměla signifikantní vliv na expresi *Ccos Hsp22*. Expresní profil genu *Ccos Seq102667* v zásadě rovněž potvrdil předběžnou analýzu (viz. Obrázek 7C). Tento gen velmi silně reaguje na vstup do diapauzy (ca. 8-krát zvýšená exprese) a poté rovněž mírně reaguje na aklimaci v suchu (další ca. 2-krát zvýšení exprese) nebo na aklimaci v chladu (další cca. 2-krát zvýšení exprese).

Protože protein *Ccos LEA3-like* vykazuje jasnou strukturní podobnost ostatním živočišným LEA3 proteinům, a protože jeho kódující gen vykazuje jasně zvýšený expresní profil po aklimacích jak v suchu, tak v chladu, rozhodli jsme se zahájit funkční analýzy právě u tohoto proteinu. Prvními předběžnými kroky byly: (1) exprese rekombinantního *Ccos LEA3-like* proteinu v bakteriálním expresním systému; (2) výroba myší protilátky specifické proti *Ccos LEA3-like* proteinu.

#### 4.2.8. Exprese rekombinantního *Ccos LEA3-like* proteinu v bakteriálním expresním systému.

Ve spolupráci s laboratoří imunologie vektorů (Sojka, Kopáček, Parazitologický ústav BC AVČR) jsem provedl expresi rekombinantního *Ccos LEA3-like* proteinu v bakteriálním expresním systému. Celkovou RNA jsem extrahoval z SDA9 larev postupem popsáním v kapitole

4.2.7.

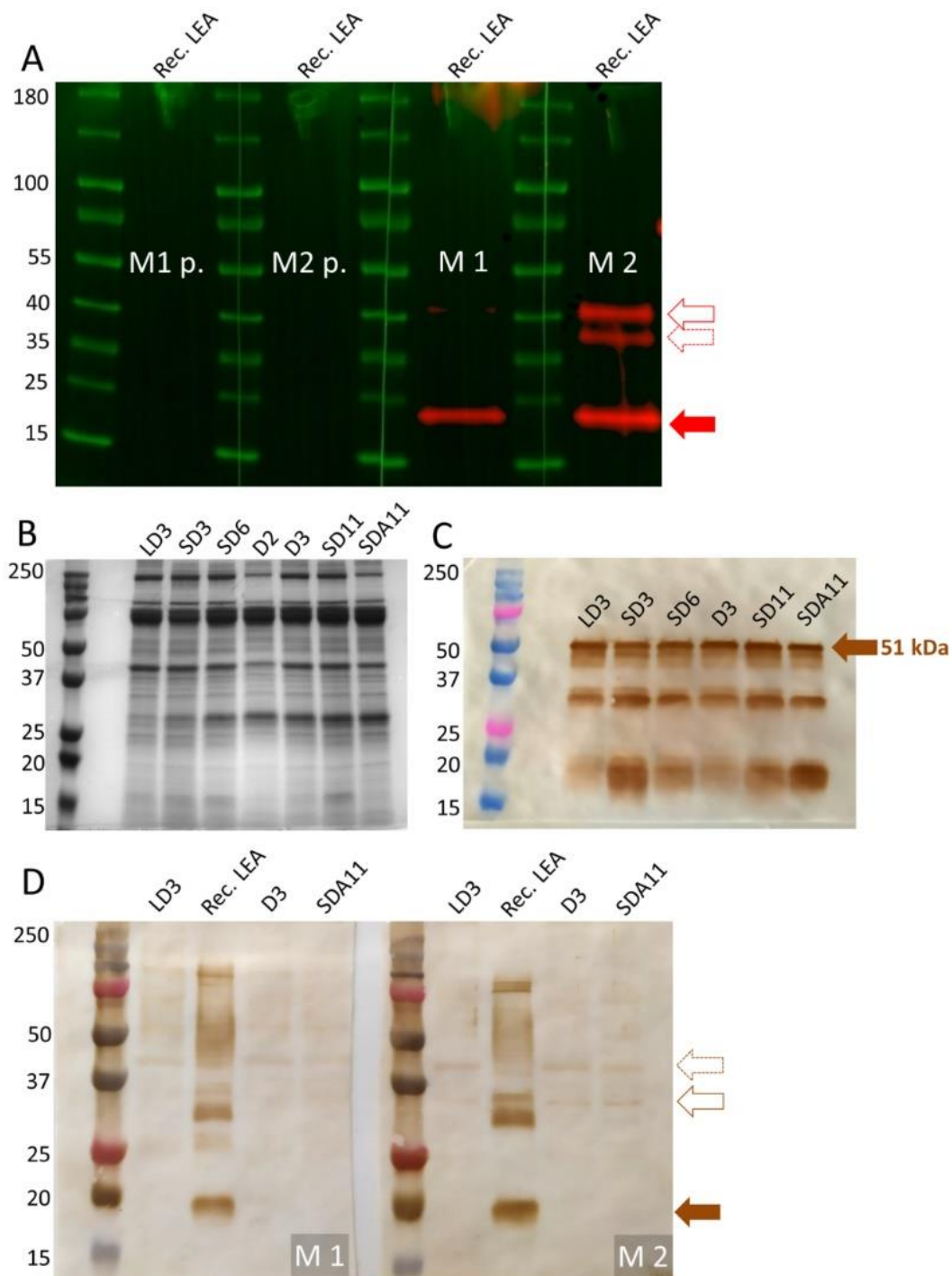
Genově specifické primery pro *LEA3like*, fw: TCACTCAAGAGCGTGGGC; rev: TCACTT CAAGTTCATCTTGCCC, jsem použil pro amplifikaci produktu o délce 633 bp pomocí polymerázy Platinum Taq High Fidelity (Invitrogen). Pročištění PCR produktu jsem provedl podle standardního protokolu systémem Wizard SV Gel and PCR Clean-up (Promega).

Pro rekombinantní expresi jsem použil bakteriální *E.coli* systém Champion™ pET SUMO (Invitrogen). Po PCR amplifikaci a zaklonování cDNA kódující LEA3-like protein do pET SUMO vektoru se vytvořil plazmid, jehož translací a následnou proteosyntézou vzniknul výsledný fúzní protein s N terminální 6xHis kotvou, SUMO šaperonem zajišťujícím správné skládání proteinu a připojenou C terminální částí LEA3-like proteinu, která je oddělena specifickým místem pro štěpení SUMO proteázou pro purifikaci LEA3-like proteinu v nativní formě. Výsledný konstrukt byl transformován a namnožen pomocí One Shot Mach1-T1 buněk (Invitrogen, ThermoFisher) a izolovaná plazmidová DNA byla ověřena sekvenací pomocí T7 forward a T7 reverse sekvenačních primerů (Invitrogen). Konstrukty se správně orientovaným zaligovaným insertem byly transformovány do expresních BL21 Star™ (DE3) *E.coli* buněk, inkubovány v 10ml LB/kanamycin médiu při 37°C a 220 RPM přes noc a touto kulturou bylo inokulováno 400ml LB media s 10 mM glukózou, kultivováno v rotační třepačce (Innova Shaker 44R, Eppendorf New Brunswick) při 140 RPM a 37°C. Po dosažení OD600=1,2 byla kultura centrifugací sedimentována (3000G/10min) a medium vyměněno za čerstvé LB medium s 1mM IPTG (isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid) indukující expresi proteinu a znovu inkubována (28°C, 140 RPM, přes noc). Výsledná kultura byla sedimentována centrifugací (3500g/10min), peleta byla promytá 20mM TRIS/HCl, pH 8.0, následovala další sedimentace 3500 g/10 min, supernatant byl odebrán a bakteriální pelet použit pro izolaci cytoplasmické frakce a purifikaci proteinu v solubilní formě. LEA3-like protein jsem dále pročistil od ostatních proteinů pomocí afinitní chromatografie navázáním polyhistidinové kotvy fúzního LEA3-like proteinu na Ni<sup>2+</sup> kolonu. Odštípnutí polyhistidinové kotvy jsem provedl pomocí SUMO proteázy (Invitrogen) dle standardního protokolu Champion™ pET SUMO (Invitrogen) v roztoku: 20mM Tris, 50mM NaCl, 50mM imidazol, 1mM DTT, pH 7,6. Výsledkem exprese se podařilo získat nativní LEA3-like protein v koncentraci 0,041 mg/ml.

#### 4.2.9. Výroba myší protilátky specifické proti Ccos LEA3-like proteinu.

Pro výrobu myší protilátky bylo použito cca. 50 µg rekombinantního LEA3-like proteinu smíchaného s 1 ml nekompletního (bez mykobakterií) Freundova adjuvans (první imunizace). Tento roztok byl injikován podkožně do myši. Imunizace se opakovala v intervalech 10-14 dní a pro druhou a třetí imunizaci bylo použito kompletní Freundovo adjuvans. Deset dní po poslední imunizaci byla myš vykřvena a z krve a buněk sleziny byla připravena imunoglobulinová frakce precipitací s kyselinou kaprylovou podle Russo a kol. (1983). Protilátku jsem testoval pomocí metody Western Blot. Protilátka se specificky vážala na rekombinantní LEA3-like protein (viz Obr. 23) nicméně ve vzorcích připravených z *C. costata* svůj cíl nenašla a vážala se nespecificky i na jiné proteiny.





**Obr. 23: Western blot analýza CcosLEA3-like proteinu.** **A)** ukazuje, že séra z obou imunizovaných myší (M1 a M2) obsahují protilátky, které rozpoznávají rekombinantní CcosLEA3-like protein (Rec. LEA) o délce ca. 20 kDa (plná červená šipka). Zároveň je vidět (zejména u séra M2) reakce s proteiny o délce ca. 40 kDa (dimery LEA?). Preimunění séra myší M1 p. a M2 p. žádné protilátky proti Rec. LEA neobsahovala. (Western blot, zeleně je značen velikostní ladder, červeně je značena protilátka navázaná na cílový protein). **B)**, paterny celkových proteinů extrahovaných z různých aklimovaných larev *C. costata* (LD3 až SDA11) se zásadně neliší (PAGE gel, značení proteinů pomocí Coomassie Brilliant Blue). **C)**, komerční protilátka proti alfa-tubulinu (12G10, DSHB, University of Iowa) dobře (i když ne zcela specificky) detekuje protein o délce 51 kDa = alfa tubulin *C. costata* (Western blot, hnědě je značena protilátka navázaná na proteiny, sekundární protilátka je značena křenovou peroxidázou HRP). **D)**, protilátky z myší M1 a M2 opět dávají jasný signál s Rec. LEA proteinem (plné hnědé šipky), avšak detekují pouze velmi slabé signály okolo 40 kDa s proteiny extrahovanými z larev *C. costata* LD3, D3 a SDA11. (Western blot, hnědě je značena protilátka navázaná na proteiny, HRP).

### 4.3. Publikace č. 2

Reprint: Příloha č. 2

#### Název: **Insect cross-tolerance to freezing and drought stress: role of metabolic re-arrangement.**

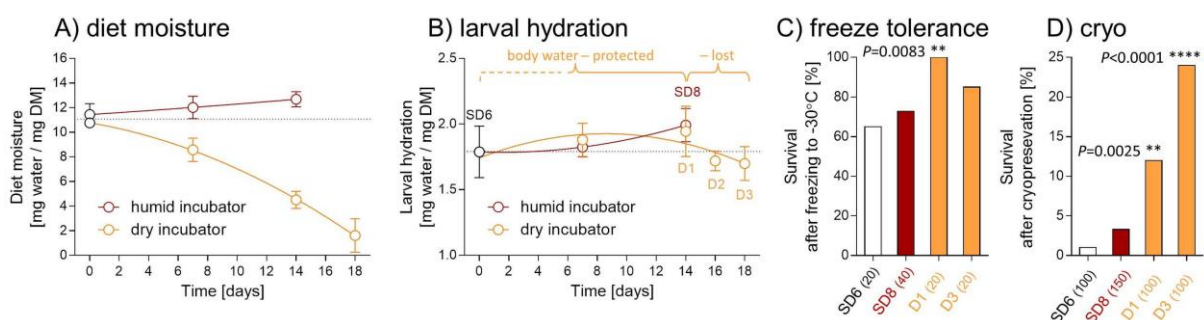
Autoři: Petr Hůla, Martin Moos, Lauren Des Marteaux, Petr Šimek a Vladimír Košťál

doi: <https://doi.org/10.1098/rspb.2022.0308>

Hlavní cíle a výsledky:

Primárním cílem této studie bylo ověřit, zdali diapauzní larvy *C. costata* tolerují evaporační dehydrataci, jaké metabolické změny ji doprovázejí a jestli aklimace larev v suchu má vliv na následné přežití larev po mrazovém stresu (tedy po mrazové dehydrataci buněk a tkání). V rámci této studie (paralelními odběry larev) byly také připraveny vzorky pro ověření expresního profilu *Ccos LEA3-like* genu po aklimaci v suchu (viz kap. 4.2.7.) Získané výsledky nám rovněž dovolily rozšířit interpretaci nad rámec provedeného experimentu a diskutovat pozorované metabolické změny v rámci eko-fyziologického konceptu cross-tolerance.

Schéma experimentu je uvedeno na Obrázku 20. Diapauzní larvy fenotypu SD6 (vychované za krátkého dne, při konstantní teplotě 18°C, za vlhkosti vzduchu blízko 100% byly rozděleny do dvou skupin. První, kontrolní skupina pokračovala v udržování diapauzy za shodných podmínek. Druhá skupina byla vystavena vzdušné vlhkosti okolo 30%, což vedlo k poměrně rychlým ztrátám vody z polotekuté diety, kde larvy žijí a následně také ke ztrátám tělní vody larev (Obr. 24A, B).



**Obr. 24.** Ztráty vody z diety (A) a tělní vody larev *C. costata* (B). Odolnost vůči mrazovému stresu (C, D). Více podrobností v textu kap. 4.3. Převzato z publikace č. 2 (Fig. 2).

Během 18 dnů expozice v suchu ztratila polotekutá dieta zhruba 80% svého původního obsahu vody (Obr. 24A). Larvy však neztratily prakticky žádnou tělní vodu. Statisticky nebyl vidět žádný rozdíl v obsahu tělní vody u larev odebíraných v různých fázích aklimace k suchu. Data však naznačují, že poslední dny expozice v suchu (mezi dny 14, 16 a 18) začaly larvy ztrácet tělní vodu a zároveň velmi rychle vymírat (Obr. 24B). Ačkoli jsme neprovedli kvantitativní analýzu mortality larev, pozorováním při odběrech bylo zřejmé, že prakticky všechny larvy jsou ještě živé ve dni 14, zatímco jen málo larev ca (15%) se dožívá dne 18, a v odběru plánovaném na den 20 již nebyla nalezena žádná živá larva (pouze živé larvy byly odebírány pro analýzy hmotnosti, přežívání v mrazovém stresu a pro metabolomické analýzy). Z těchto výsledků je patrné, že larvy *C. costata* mají jen velmi nízkou schopnost tolerovat ztrátu tělní vody a jakmile k ní začíná docházet, způsobuje rychlou mortalitu. Poněkud paradoxně, larvy vystavené suchu vykazovaly signifikantně silnější toleranci vůči mrazovému stresu (-30°C, Obr. 24C) a, především, výrazně vyšší přežití po kryoprezervaci v kapalném dusíku (Obr. 24D).

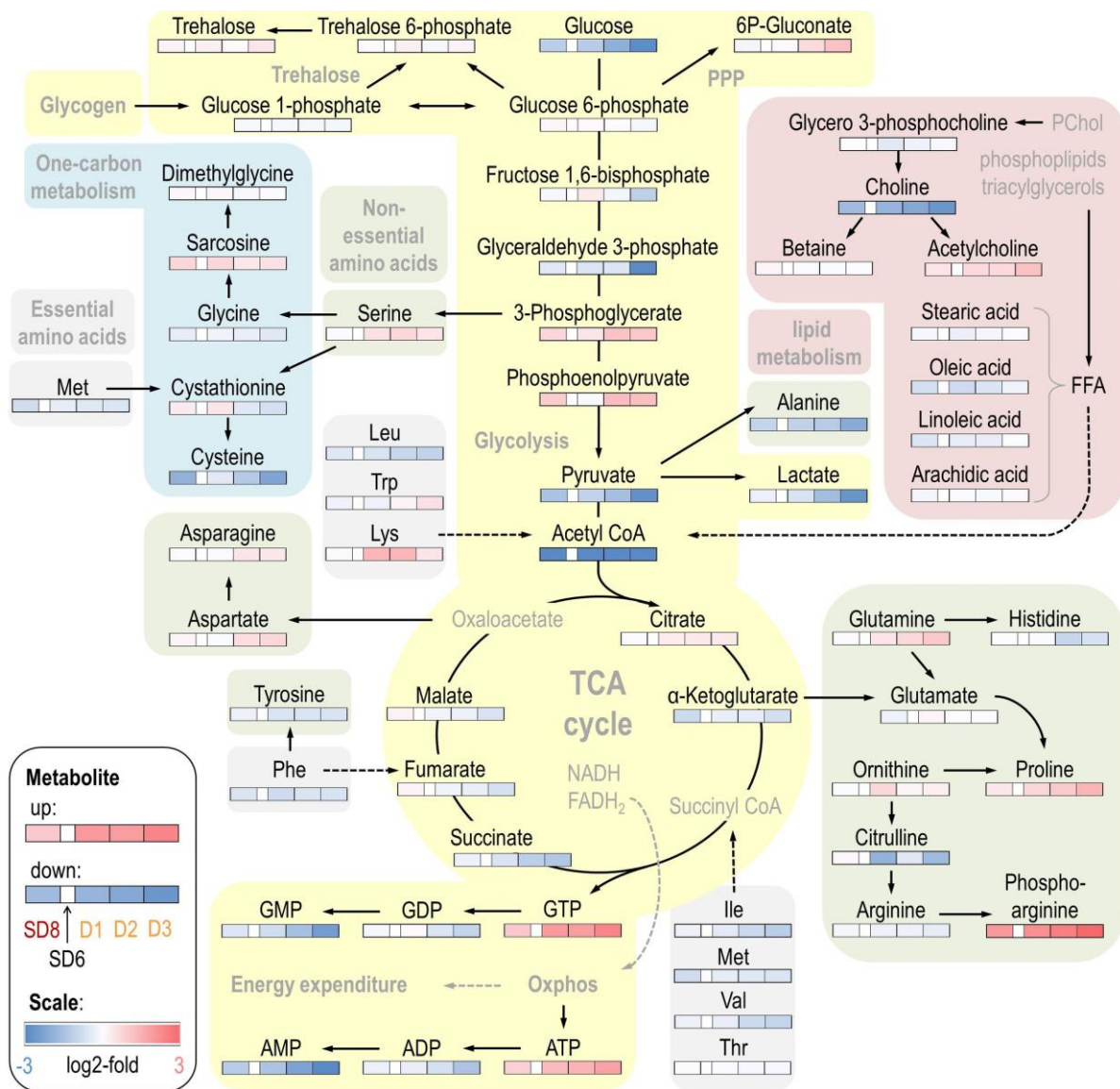
Dále byla provedena metabolomická analýza larev odebíraných v různých fázích udržování diapauzy za relativně vysoké teploty a ve vlhku (SD6, SD8) a larev vystavených téže teplotě, ale suchu (D1, D2, D3). Globální statistická analýza výsledků cílené kvantitativní analýzy 36 metabolitů pomocí PCA (Principal Component Analysis, Canoco v. 5.10) ukázala na signifikantní rozdíly v metabolómu larev D1 a SD8 které byly stejně staré (14 dnů), měly prakticky shodné živé i suché hmotnosti a nevykazovaly ještě žádnou mortalitu. Tyto rozdíly se dále prohlubovaly s další aklimací larev v suchu (D2, D3) a hlavními komponentami byly na jedné straně silná akumulace aminokyselin prolinu, glutaminu a asparaginu (nárůst z celkových 61 na 167 nmol.mg<sup>-1</sup> čerstvé hmotnosti mezi fenotypy SD6 a D3), zároveň mírná akumulace trehalózy a sorbitolu (nárůst z 12,2 na 15,3 nmol.mg<sup>-1</sup> mezi fenotypy SD6 a D3) a na druhé straně mírný pokles aminokyselin leucinu, izoleucinu a valinu (pokles z 1,5 na 0,8 nmol.mg<sup>-1</sup> mezi SD6 a D3) (Fig. 3, publikace č. 2).

Výsledek relativní metabolomické analýzy 60 metabolitů je vizualizován na Obrázku 25, který schematicky ukazuje základní dráhy intermediárního metabolismu. Hlavní pozorovatelné změny u larev aklimovaných v suchu lze shrnout takto:

- akumulace prolinu, glutaminu, asparaginu a některých dalších ne-esenciálních aminokyselin;
- mírná akumulace trehalózy;
- akumulace serinu a sarkosinu za současné deplece cholinu, glycinu, methioninu a cysteinu (změny 1C-metylačním metabolismus);
- deplece valinu, leucinu, izoleucinu a některých dalších esenciálních aminokyselin;
- aktivace pentózového cyklu, naznačená akumulací 6-fosfoglukonátu, která poskytuje NADPH pro redukci glukózy na sorbitol, nebo pyrolinu na prolin;
- silná akumulace různých fosfagenů (ATP, GTP, fosfoarginin, fosfoglycerát, fosfoenolpyruvát) za současné deplece ADP, AMP, GDP a GMP.

Z hlediska širší interpretace výsledků metabolické analýzy jsou podstatné tyto dva poznatky: **(1)** Všechny výše uvedené změny byly pozorovány nejen u larev vystavených suchu (D1, D2 a D3), ale, ve formě kvalitativního trendu, také u larev udržujících diapauzu ve vlhku (SD8),

rozdíly byl v kvantitativní změně (relativně velká změna v suchu vs. malá změna ve vlhku). (2) Všechny výše uvedené změny jsou pozorovatelné také u larev vystavených chladové aklimaci (Košťál a kol., 2011b; Rozsypal a kol., 2018b; Moos a kol., 2022; Grgac a kol., 2022).



**Obr. 25. Vizualizace změn v metabolických drahách larev *C. costata* během aklimace v suchu.** Výsledky byly získány metabolickou analýzou na HILIC koloně (kapalinová chromatografie na Dionex Ultimax 3000, ThermoFisher) kombinovanou s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením (Orbitrap Q Exactive Plus, ThermoFisher). Výsledky relativní kvantifikace (plocha analytického píku) jsou uvedeny formou heat-mapy (log<sub>2</sub>-fold differences), jejíž výšek je uveden specificky pod každým názvem metabolitu. Výchozí situace (SD6) má bílou barvu. Směrem doprava od SD6 jsou změny během aklimace v suchu (D1, D2, D3). Směrem doleva od SD6 je změna ve vlhku (SD8). Modré odstíny značí relativní pokles, červené odstíny značí relativní nárůst koncentrace metabolitu. Převzato z elektronické přílohy k publikaci č. 2 (Fig. S2).

#### 4.4. Publikace č. 3

Reprint: Příloha č. 3

Název: **A mixture of innate cryoprotectants is key for freeze tolerance and cryopreservation of a drosophilid fly larva.**

Autoři: Lukáš Kučera, Martin Moos, Tomáš Štětina, Jaroslava Korbelová, Petr Vodrážka, Lauren Des Marteaux, Robert Grgac, Petr Hůla, Jan Rozsypal, Miloš Faltus, Petr Šimek, Radislav Sedláček, Vladimír Košťál

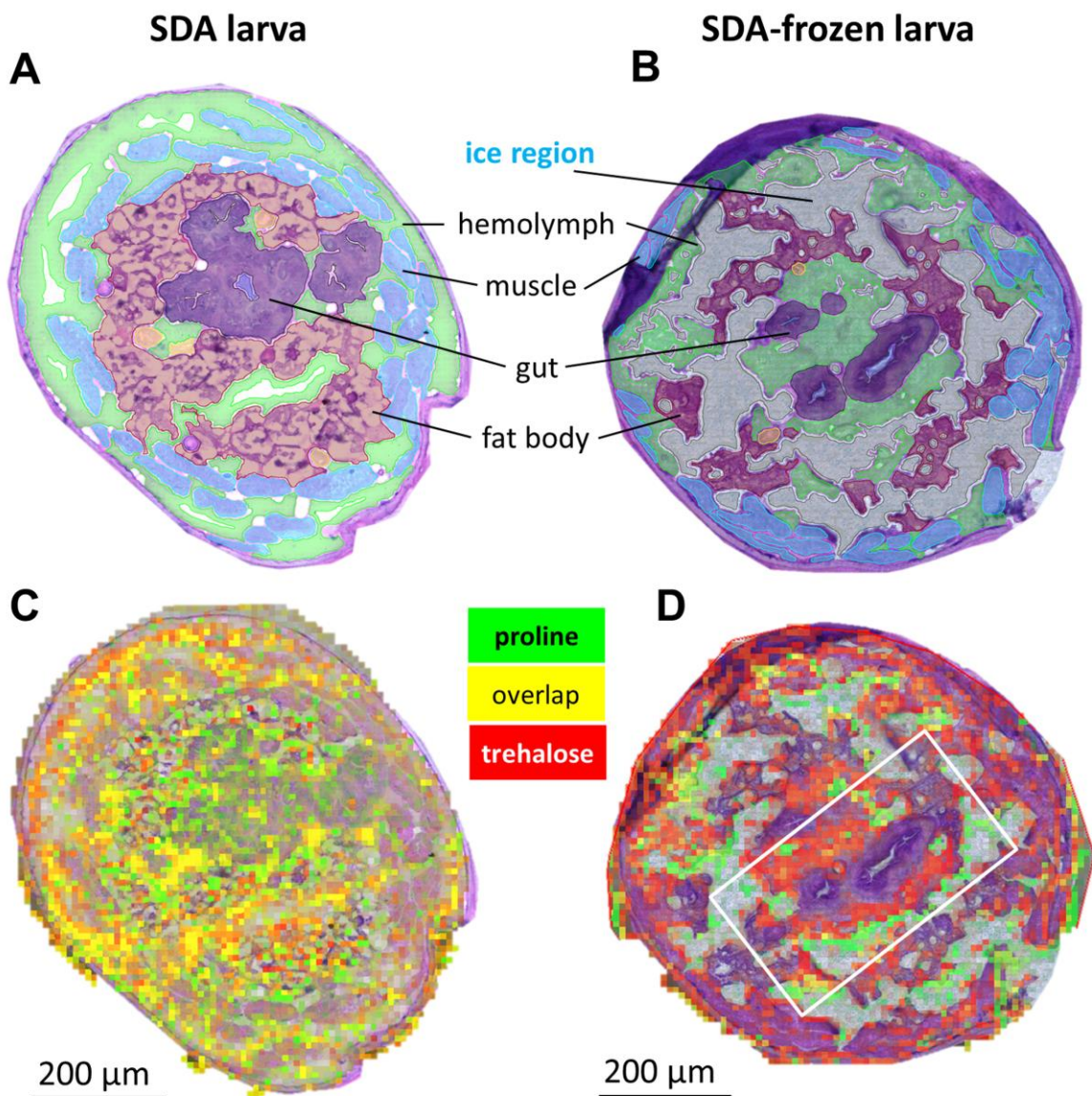
doi: <https://doi.org/10.1242/jeb.243934>

Hlavní cíle a výsledky:

Cílem této studie bylo identifikovat přesné složení kryoprotektivní směsi, kterou akumulují larvy *C. costata* během své chladové aklimace. Kromě metabolomické analýzy tkání larev za pomoci sofistikovaných metod GC-LC/MS (Šimek, Moos) byla předmětem studia tkáňová lokalizace kryoprotektantů a její případné změny v průběhu pomalého inokulativního mrznutí larev. K tomuto cíli byla originálně (poprvé pro obor chladové odolnosti hmyzu a poprvé pro obor kryoprezervace biologického materiálu) použita analýza pomocí MALDI-MSI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging, Kučera, Sedláček). Zároveň byly testovány termální vlastnosti umělých směsí kryoprotektantů pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC, Rozsypal, Faltus).

Kvantitativní metabolomickou analýzou bylo stanoveno celkem 49 látek ve čtyřech tkáních dvou larválních fenotypů LD a SDA s kontrastní freeze-tolerancí (minimální a maximální). Některé látky vykázaly velký koncentrační nárůst při přechodu mezi fenotypy LD a SDA – tyto jsou kandidátními molekulami kryoprotektivní směsi. Výsledkem analýzy je finální složení specifické kryoprotektivní směsi, která se pravděpodobně významně podílí na zajištění extrémní tolerance SDA larev *C. costata* vůči mrazovému stresu a umožňuje jejich přežití v kapalném dusíku: koncentrace jsou uvedeny v mmol.l<sup>-1</sup> larvální hemolymfy: prolin, 313; trehalóza, 108; glutamin; 55; asparagin, 26; betain; 6,1; glycerofosfoetanolamin, 4,0; glycerofosfocholin, 2,9; a sarkosin, 0,5.

Bylo zjištěno, že kandidátní kryoprotektanty jsou primárně akumulovány v hemolymfě, ačkoli nárůst jejich koncentrací byl pozorovatelný i v ostatních tkáních. Patrně nejcennější bylo ovšem zjištění, že dvě hlavní látky směsi, prolin a trehalóza, mají synergický účinek na přežití larev v kapalném dusíku a chovají se odlišně při pomalém inokulativním mražení SDA larev. MALDI-MSI analýza odhalila, že trehalóza zůstává při postupném promrzání převážně v hemolymfě, kde se koncentruje, zatímco prolin migruje směrem z dehydratujících tkání a hemolymfy na hranici s nově vznikajícím regionem extracelulárního ledu (Obr. 26).



**Obr. 26. MALDI-MSI analýza prolinu a trehalózy během pomalého mrznutí larev *C. costata*.** Transversální řezy středem těla dvou larev *C. costata*. Larva na panelech A a C je před začátkem pomalého inokulativního promrzání extracelulárních prostor (při teplotě 4°C). Larva na panelech B a D je na konci promrzání, při teplotě -30°C. Horní panely A a B ukazují rozložení jednotlivých tkání (tkáně jsou pro názornost zvýrazněny barvami). Na panelu B je dobře vidět velký region extracelulárního ledu (šedě), který se vytvořil mezi tkáněmi (68% tělní vody se přeměnilo v led). Tkáně jsou dehydratované, jejich objem se zmenšil. Dolní panely C a D ukazují výsledek analýzy MALDI-MSI. Prolin je značen zeleně, trehalóza červeně, regiony, kde se vyskytují obě látky zároveň se stejnou intenzitou signálu jsou žluté (mísení barev). Vidíme, že před mražením (C) převládá na řezu žlutá barva (kolokalizace obou látek) a nejintenzivnější signál je v hemolymfě. Po promražení se obě látky oddělily (D), maximální signál trehalózy (červená) zůstává v regionu dehydratované hemolymfy, maximální signál prolinu (zelená) se posunul z hemolymfy a tkání na hranici regionu ledu.

Analýza termálního chování různých směsí kryoprotektantů, a porovnání s chováním hemolymfy, přinesla hypotetické vysvětlení pro rozdílné chování trehalózy a prolinu během mrznutí. Trehalóza stimuluje skelný přechod a po zasklení vytváří amorfní matici v

dehydratované hemolymfě a patrně i tkáních. Prolin neprochází skelným přechodem, je extrémně rozpustný ve vodných roztocích, které se dehydratací koncentrují (koncentrace prolinu přesahují 1M). Prolin zůstává mobilní i za vysokých koncentrací, migruje spolu s vodou, která odchází z dehydratovaných tkání směrem k rostoucím ledovým krystalům. Prolin se poté koncentruje na hranici s extracelulárním ledem, kde patrně vytváří mechanicky-pufrační vrstvičku visko-elastické tekutiny (viditelná na Obrázku 26D jako jasně zelené ohraničení ledu).

## 5. Diskuse

Soubor výsledků představený v této disertační práci propojuje fyziologické adaptace hmyzu na podnulové teploty a promrzání tělních tekutin s adaptacemi na vysychání prostředí a případnou ztrátu tělních tekutin evaporací. Diapauzní, chladově aklimované larvy octomilky *C. costata* přezimující ve svém přirozeném prostředí jsou snadno inokulovány okolním ledem a jejich tělní tekutiny promrzají. Při promrzání dochází k mrazové dehydrataci jejich buněk. Larvy promrznutí přežijí a v laboratorních podmínkách je můžeme dokonce vystavit teplotám kapalného dusíku beze ztráty životaschopnosti (Moon a kol., 1996; Košťál a kol., 2011b).

Výsledky disertace naznačují, že aklimace larev v chladu a v suchu mohou vést k podobným změnám v metabolismu, k produkci a akumulaci nízkomolekulárních látek s kryoprotektivním účinkem a dále k expresi specifických proteinů, zejména proteinů z rodiny Late Embryogenesis Abundant, LEA. Kryoprotektivní význam některých studovaných látek (prolin, trehalóza) je poměrně dobře znám z literatury (Salt, 1961; Sømme, 1982; Zachariassen, 1985; Lee, 2010a) a v této práci přináším další důležité poznatky k mechanismu jejich působení v promrzajícím organismu larvy *C. costata*. Ochranná role LEA proteinů v dehydratovaném organismu je rovněž dobře známa, i když konkrétní mechanismy jsou popsány spíše hypoteticky (Janis a kol., 2018). Kryoprotektivní význam LEA proteinů se teprve v současnosti stává předmětem studia (Wang a kol., 2020) a o LEA proteinech se začíná uvažovat jako o významné složce protektivní směsi pro kryoprezervaci savčích i lidských buněk (Li a kol., 2022). V této práci přináším prvotní charakterizaci potenciálního LEA3-like proteinu *C. costata*, což otevírá cestu k navazujícím analýzám jeho kryoprotektivní funkce, zejména v synergii s nízkomolekulárními kryoprotektanty.

### 5.1. Transkriptomická aklimační odpověď larev *C. costata* na chlad

Globální analýza transkriptomu pomocí Illumina RNAseq u diapauzních larev *C. costata* vystavených chladové aklimaci nám umožnila vytipovat geny a celé procesy, které ji doprovázejí (Des Marteaux a kol., 2019, publikace č. 1). Nejvýraznější komplexní změnou bylo navýšení četnosti transkriptů kódujících různé elementy procesů spojených se skládáním nativních proteinů v endoplazmatickém retikulu, s rozpoznáváním chybně složených proteinů a jejich retrotranslokací z ER do cytoplazmy, s šaperonovou funkcí v cytoplazmě, značením proteinů ubikvitinovým signálem a jejich finálním odbouráváním v proteazómech (Obr. 8 a 9). Podobné změny jsou obvykle pozorovány u různých organismů až po silném stresu, ať už tepelném nebo jiném, kdy se v organismu náhle objeví velké množství poškozených, částečně denaturovaných proteinů (Lindquist a Craig, 1988; Korsloot a kol., 2004). V našem případě však tyto změny doprovázely postupnou, dlouhodobou chladovou aklimaci za nadnulových teplot, což je zcela přirozený proces, který má navíc adaptivní charakter, jelikož vede k přípravě larev na zimu a ke zvýšení jejich chladové odolnosti na maximum. Navýšení četnosti transkriptů kódujících inducibilní šokové proteiny, nejčastěji Hsp70, bylo již dříve pozorováno v souvislosti se vstupem do diapauzy a s přípravou na zimu také u jiných druhů hmyzu (Rinehart a kol., 2006; King a MacRae, 2015; Toxopeus a kol., 2019). Naše studie ovšem dokládá, že se jedná o velmi komplexní upregulační odpověď, která kromě typických šokových proteinů zahrnuje prakticky všechny kroky procesu od rozpoznání až po odbourání chybně složených proteinů. Zároveň jsme nepozorovali žádné známky upregulace ve třech



různých drahách (PERK, ATF6, IRE1), které iniciují tzv. Unfolded Protein Response (UPR) v reakci na přítomnost chybně složených proteinů (Strudwick a Schröder, 2007). Z tohoto výsledku usuzujeme, že změny pozorované u larev *C. costata* jsou profylaktického charakteru. Změny mohou být komplexní přípravou na nadcházející eventualitu promrznutí tělních tekutin, dehydratace tkání a následného tání a rehydratace, kdy se mohou objevit toxické, chybně složené proteiny, a přitom je obtížné spustit komplexní adaptivní reakci za nízkých teplot nad nulou.

Očekávali jsme, že se v transkriptomické odpovědi na chladovou aklimaci larev objeví také stopa po změnách v metabolismu kryoprotektantů prolinu a trehalózy, neboť tyto jsou během chladové aklimace silně akumulovány. V případě trehalózy byla tato stopa patrná, avšak nepříliš komplexní. Zahrnovala upregulaci genů kódujících anabolické enzymy trehalózo-fosfát syntázu a fosfatázu a zároveň down-regulaci genu pro katabolický enzym trehalázu. V případě prolinu byla stopa prakticky nepřítomná nebo nejasná, zahrnovala pouze downregulaci prolidázy a delta-1-pyrrolin-5-carboxylát syntetázy, přičemž oba tyto enzymy jsou na anabolické dráze prolinu. V paralelní studii z naší laboratoře (Moos a kol., 2022) byla pomocí qRT-PCR cíleně zkoumána komplexní transkripční odpověď 42 genů metabolismu prolinu a 23 genů metabolismu trehalózy během chladové aklimace larev *C. costata*. Podobné studie, které komplexně pokrývají určitou metabolickou dráhu, omezují známý nedostatek transkriptomických studií: relativně nízká a velmi různá korespondence mezi četností transkriptů a aktivitou proteinů (Feder a Walser, 2005; Suarez a Moyes, 2012). Studie Moose a kol. (2022) potvrdila a dále rozšířila poznatky získané v rámci mé disertace. Relativně jasný transkriptomický signál v případě trehalózy naznačuje, že trehalóza je syntetizována převážně z larválních makromolekulárních zásob ve formě glykogenu. Glykogen je silně akumulován během intenzivního žíru larev před vstupem do diapauzy a v průběhu chladové aklimace je pak částečně spotřebován, přičemž deplece glykogenu stechiometricky odpovídá právě akumulaci trehalózy. Podobně, také u prolinu jsme předpokládali, že jeho zdrojem budou larvální makromolekulární zásoby ve formě buď hexamerních proteinů nebo kolagenů v extracelulární matrix (ECM). Mnoho druhů hmyzu, včetně larev *C. costata*, akumuluje hexamerní zásobní proteiny před vstupem do diapauzy (Powell a kol. 1984). Tyto proteiny ovšem většinou přetrvávají až do ukončení diapauzy na jaře. Kolageny obsahují velké množství prolinu a hydroxyprolinu (Li a Wu, 2018) a ten může sloužit, po degradaci metaloproteinázami, jako významný zdroj prolinu (Phang a kol., 2015). Analýzy aktivity metaloproteináz, změn v obsahu kolagenu a celkových proteinů, změn v transkripci příslušných genů a zejména stechiometrický výpočet však ukázaly, že kolageny, ani jiné proteiny, nemohou být hlavním zdrojem akumulovaného prolinu u larev *C. costata*. Překvapivým zdrojem se ukázala být larvální dieta. Zjistili jsme, že diapauzní a chladově aklimované larvy stále přijímají potravu (i za teploty 4°C) a dokážou z ní asimilovat značné množství jednak přímo prolinu a také jeho bezprostředních prekursorů glutamátu a ornithinu. Dále larvy získávají prolin enzymatickou transformací glutaminu, jehož zásoby byly naakumulovány před vstupem do diapauzy (Moos a kol., 2022).

## 5.2. Detekce LEA3-like proteinu u *C. costata*

Důležitým výsledkem transkriptomické studie (Des Marteaux a kol., 2019, publikace č. 1) jsou vytipované kandidátní geny (sekvence, kontigy), které kódují dosud necharakterizované nebo zcela neznámé proteiny, jejichž transkripce se silně zvyšuje se vstupem do diapauzy a po následné chladové aklimaci. Naším dlouhodobým cílem je pokračovat s funkčními analýzami takových proteinů. Očekávali jsme, že transkriptomická studie by mohla mezi upregulovanými sekvencemi odhalit také LEA-like proteiny. Toto očekávání se však nenaplnilo, a proto jsme začali pátrat po přítomnosti LEA-like sekvencí přímo v publikovaném transkriptómu (Pouparin a kol., 2015) a posléze i genómu *C. costata* (Kim a kol., 2021). Tyto výsledky představuje kapitola 4.2. a zde je pouze stručně shrnutí: kombinací prohledávání transkriptomu a genomu pomocí klasického algoritmu BLAST i pomocí speciálního algoritmu MAST (POPP), sekvenováním PCR produktů z mRNA a gDNA templátů, podobnostními analýzami (ClustalW a Tree, Geneious), a analýzou struktury hypotetického proteinu pomocí mnoha různých nástrojů (TargetP, SignalP, PredictProtein, Psipred, Disopred3, I-Tasser) jsme nakonec dospěli k sekvenci genomového lokusu, který obsahuje gen velmi pravděpodobně kódující pro LEA3-like protein *C. costata*. Podobně jako u dalších organismů, také gen *CcosLEA3-like* jsme zařadili mezi LEA proteiny na základě strukturní příbuznosti k rodině LEA3 a dále na základě jeho transkripčního profilu. Přiřazení na základě funkční analýzy je v současnosti obtížné, neboť mechanistické modely funkcí LEA proteinů jsou dosud spíše hypotetické (Janis a kol., 2018).

Pro naši práci bylo podstatné zjištění, že gen *CcosLEA3-like* je transkripčně upregulován nejen v odpovědi na sucho, ale zejména v odpovědi na chladovou aklimaci (Obr. 21). Pokusil jsem se získat rekombinantní protein *CcosLEA3-like* o celkové délce 210 aminokyselin (bez signálního peptidu) pomocí bakteriálního expresního systému. Výtěžek čistého proteinu byl však příliš nízký pro započítání plánovaných funkčních testů (ochrana vybraných enzymů před ztrátou aktivity po zmrazení, ochrana plazmatických membrán před ztrátou integrity po zmrazení, testy podle Grgac a kol., 2022). Množství proteinu stačilo pouze k přípravě myšího antiséra obsahujícího protilátky proti rekombinantnímu proteinu. Analýza proteinů extrahovaných z larev *C. costata* pomocí Western blotu však neměla jasný výsledek, nepodařilo se mi detekovat žádný protein, který by svou velikostí odpovídal očekávanému *CcosLEA3-like* proteinu (pod 20 kDa) (Obr. 23). V mezičase byla přítomnost proteinu *CcosLEA3-like* v extraktech z larev *C. costata* potvrzena proteomickou analýzou trypsinizovaných proteinových štěpů pomocí MS (spolupráce s Karlem Harantem, Biocev, Vestec, nepublikované výsledky). Připravujeme proto nové kolo pokusů o produkci proteinu ve větším množství a kvalitě.

## 5.3. Metabolomická odpověď larev *C. costata* na aklimace v suchu a chladu

V této studii (Hůla a kol., 2022; publikace č. 2) jsme aklimovali diapauzní larvy *C. costata* v postupně vysychající dietě za relativně vysoké teploty 18°C. Chtěli jsme tak simulovat možnou situaci, kdy jsou diapauzní larvy přezimující pod kůrou padlých stromů, ještě před nástupem nízkých teplot, vystaveny vysychání v jejich prostředí. Předpokládali jsme, že vysychající larvy budou vykazovat zvýšenou transkripci *CcosLEA3-like* genu a produkci *CcosLEA3-like* proteinu. Tento předpoklad se podařilo předběžně potvrdit, ale výsledky

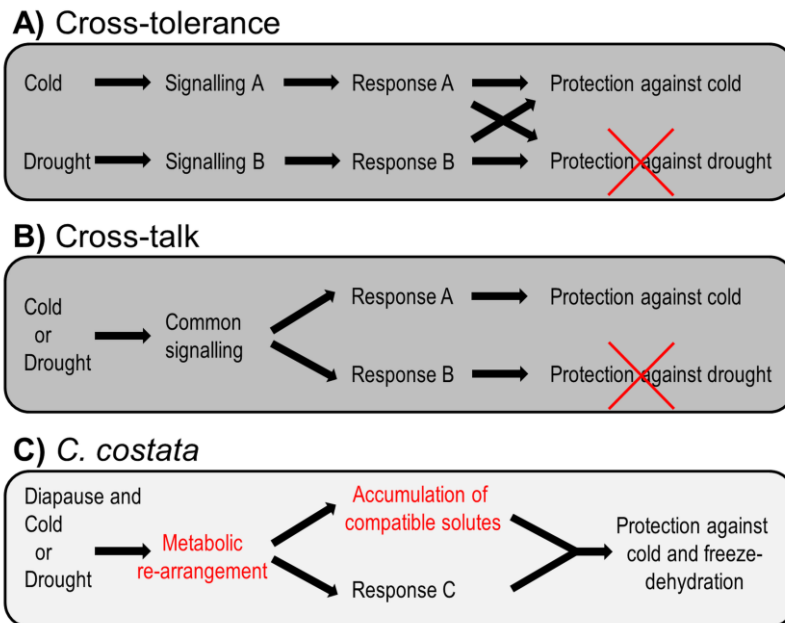
nejsou dosud publikovány. Aklimace larev ve vysychajícím prostředí skutečně vedla ke zvýšení četnosti mRNA transkriptů pro *CcosLEA3-like* gen (Obr. 21) i ke zvýšení četnosti trypsinových štěpů *CcosLEA3-like* proteinu (proteomická analýza, nepublikovaná data). Dále jsme předpokládali, že aklimace povede ke změnám v metabolismu, a že výsledkem aklimace bude zvýšená odolnost larev nejen k suchu (k evaporační dehydrataci), ale zároveň také k mrazové dehydrataci (cross-tolerance). Na základě teoretického konceptu cross-tolerance (Sinclair a kol., 2013) jsme předpokládali, že společnou biochemickou podstatou této "křížové odolnosti" vůči dvěma různým stresorům může být právě akumulace LEA3 proteinů (Pouchkina-Stantcheva, 2007; Goyal a kol., 2005; Boswell a kol., 2014) a zejména pak trehalózy (Block, 1996; Ring a Danks, 1994; 1998; Pullin, 1996; Danks, 2000; Benoit a kol., 2007).

Jeden důležitý předpoklad studie se ovšem nenaplnil: larvy vystavené postupně vysychajícímu prostředí neztrácely téměř vůbec tělní vodu, alespoň ne po dobu ca. prvních 14 dnů aklimace v suchu. Jakmile začaly tělní vodu ztrácet (mezi 14 a 18 dnem), znamenalo to prudký nárůst jejich mortality. Ukázalo se, že diapauzní larvy *C. costata* nejsou vůbec připraveny na eventualitu vysychání a nelze je úspěšně aklimovat na suchu. Tento fakt nejenže zamezil dalším pokusům se suchovzdorností larev, ale ovlivnil i interpretaci našich výsledků vzhledem k teoretickému konceptu cross-tolerance (larvy netolerují oba stresory, ale pouze jeden z nich – mrazovou dehydrataci).

V souladu s literaturou (Ring, 1994; Sinclair a Chown, 2003; Levis a kol., 2012; , Elnitsky a kol., 2008), a také poněkud paradoxně, jsme pozorovali, že u larev vystavených suchu, tedy nikoli aklimovaných, ale „odsouzených k smrti“, dramaticky roste odolnost vůči promrzání a zejména schopnost přežít kryoprezervaci v kapalném dusíku. Jedním z možných mechanismů zodpovědných za tuto změnu může být pozorovaná upregulace *CcosLEA3-like* proteinu. Tuto možnost jsme však dosud neověřili ve funkčních testech (viz kapitola 5.2.). Dalším zodpovědným mechanismem by mohla být akumulace kryoprotektantů. Naše podrobná metabolická analýza tuto možnost podpořila. Larvy vystavené suchu skutečně vykazovaly změny v metabolómu velmi podobné změnám pozorovaným u larev vystavených chladové aklimaci – včetně silné akumulace aminokyselin prolinu, glutaminu a asparaginu a mírné akumulace trehalózy a sorbitolu.

Provedli jsme srovnání metabolických profilů u larev aklimovaných ve třech různých environmentálních podmínkách, které mají velmi různé důsledky na fenotyp a přežití larev: suchu, které je *stresorem* způsobujícím mortalitu (Hůla a kol., 2022), chlad, který je aklimačním *stimulem* způsobujícím zesílení chladové odolnosti (Košťál a kol., 2011b; Rozsypal a kol., 2018b; Kučera a kol. 2022), a krátký den, který je kalendářním *signálem* způsobujícím vstup do larvální diapauzy a její udržování (Moos a kol., 2022). Všechny tři profily vykazovaly zásadní kvalitativní shody (změny v koncentracích jednotlivých látek měly stejný směr) a rozdíly byly pouze v kvantitě (změny koncentrací jednotlivých látek byly různě velké). Ve všech třech případech jsme pozorovali, kromě akumulace kryoprotektantů, také akumulaci energeticky bohatých molekul – fosfagenů (ATP, GTP, fosfoarginin, fosfoglycerát, fosfoenol pyruvát) za současné deplece ADP, AMP, GDP a GMP. Na základě těchto výsledků jsme vyslovili hypotézu, že společným jmenovatelem působení všech tří environmentálních faktorů na larvy může být metabolická suprese: suchu způsobuje supresi skrze potíže v příjmu vysychající potravy a hladovění; chlad působí klasicky skrze zpomalení biochemických dějů ( $Q_{10}$ ); a diapauza je již z definice spojena se snížením rychlosti

metabolismu a celkovou inaktivitou. Metabolická suprese může mít sekundární efekty na přestavbu metabolických drah, které se odklánějí od produkce a spotřeby energie ve formě ATP směrem ke drahám, ve kterých se přednostně akumulují jako koncové produkty ty metabolity, jejichž rozpustnost ve vodě je relativně vysoká (vysoký akumulací potenciál), zatímco jejich toxicita je relativně nízká. Tyto látky můžeme kolektivně nazývat kompatibilními osmolyty (Arakawa a Timasheff, 1982) (Obr. 27).



**Obr. 27. Přestavba metabolických drah spojená s metabolickou supresí způsobuje akumulaci kompatibilních osmolytů.** Larvy *C. costata* vystavené suchu nezvyšují svou odolnost vůči suchu (červené kříže), a proto nelze hovořit o cross-toleranci ve smyslu konceptu (A, B) podle Sinclair a kol. (2013). Přesto pozorujeme (C), že larvy vystavené různým faktorům prostředí, které způsobují metabolickou supresi, vykazují podobné změny v metabolických drahách, jejichž výsledkem je uniformní akumulace látek typu kompatibilních osmolytů a zvýšená odolnost proti chladu a mrazové dehydrataci.

Akumulace látek typu kompatibilních osmolytů (jednoduchých cukrů, polyolů, vybraných aminokyselin a metylaminů) byla stereotypicky pozorována u mnoha organismů prakticky všech skupin (od prokaryot, přes rostliny až po obratlovce) vystavených nejrozličnějším stresorům (od dehydratace, přes osmotické a teplotní stesy, až k extrémním tlakům či působení chemických toxických látek) (Crowe, 2007; Carpenter a Crowe; Arakawa a Timasheff, 1982). Společným jmenovatelem bezprostřední odpovědi na stresor je často právě metabolická suprese. Kompatibilní osmolyty, kromě své nízké toxicity a schopnosti kompenzovat osmotické změny, mají také schopnost chránit makromolekulární komplexy před ztrátou jejich funkční struktury (konformace). Tyto protektivní schopnosti jsou teoreticky založeny na termodynamice nekovalentních interakcí mezi molekulami vody, kompatibilními osmolyty a chráněnými strukturami (Timasheff, 1992b; Timasheff, 2020; Timasheff, 1993). Chráněnými strukturami jsou nativní konformace proteinů, uspořádání lipidických dvojvrstev, nebo i struktura dvoušroubovice DNA.

Naše výsledky tedy podporují možný scénář (Pullin, 1996), kdy evoluce diapauzy hmyzu v tropickém teplém prostředí vedla přes metabolickou supresi k nízké (automatické) akumulaci

původně neutrálních látek typu kompatibilních osmolytů. Později mohla tato akumulace být předmětem pozitivní selekce, když se projeví její výhody při ochraně před účinky dehydratace. Ještě později mohla být akumulace pozitivně selektována při kolonizaci temperátních a polárních habitatů, kde se mohly uplatnit ochranné účinky kompatibilních osmolytů při kryoprotekci.

Přesto, že larvy *C. costata* akumulovaly po vystavení suchu i chladu typické kompatibilní osmolyty a upregulovaly expresi LEA3-like proteinu, tak jejich odolnost vůči suchu se nijak nezvýšila. Naše výsledky tak ukazují, že ačkoli je ekologicko-evoluční koncept cross-tolerance založen na logicky robustních předpokladech, jeho mechanistický přímý důkaz nemusí být jednoduchý a nemůže být založen na jediném mechanismu – například na akumulaci trehalózy (Ring, 1994; Ring, 1998; Benoit a kol.; Brown, 1978). Důkaz vyžaduje komplexní přístup a funkční analýzy různých mechanismů, které pravděpodobně působí v synergickém celku.

#### 5.4. Funkční analýza kryoprotektivní směsi *C. costata*

V publikaci č. 3 (Moos a kol., 2022) jsme detailně analyzovali a popsali složení kryoprotektivní směsi látek, kterou během chladové aklimace akumulují diapauzní larvy *C. costata*. Fakt, že kompatibilní osmolyty jsou často akumulovány ve formě komplexních směsí je dobře znám (Storey a Storey, 1985; Storey a Storey, 1988; Toxopeus a kol., 2019). Teoreticky mohou jednotlivé látky ve směsi působit aditivně nebo dokonce synergicky. Je například ověřeno praxí, že směsi kryoprotektivních látek jsou účinnější při dlouhodobé kryoprezervaci savčích buněk než jedno-komponentní média (Elliott a kol., 2017). Analýza mechanismů působení celé směsi je však náročnější než analýza vlastností jednotlivých látek. Navíc, směsi látek mohou mít tzv. emergentní fyzikálně-chemické vlastnosti, tedy vlastnosti, které nejsou pouhým součtem či průnikem vlastností jednotlivých látek. Například, poměrně nedávno byl formulován koncept tzv. NADES směsí (Natural Deep Eutectic Systems) (Dai a kol., 2013; Choi a kol., 2011). V zásadě jde o směsi kompatibilních osmolytů, které v určitém látkovém poměru vykazují mnohem nižší hodnotu bodu tání než jednotlivé komponenty směsi, a to hlavně díky četným interakcím pomocí vodíkových můstků mezi komponentami (Dai a kol., 2015). Tyto směsi hypoteticky tvoří další biologické prostředí (kromě vodného kapaného a lipidického uspořádaného), ve kterém se mohou rozpouštět makromolekuly a které zajišťuje specifické buněčné funkce. Kromě jiných také funkce při ochraně makromolekul před účinky dehydratace a extrémních teplot (Castro a kol., 2018; Gertrudes a kol., 2017; Liu a kol., 2018). NADES směsi jsou rovněž uvažovány jako nová, slibná média pro kryoprezervaci biologického materiálu (Hornberger a kol., 2021).

Na základě výsledků analýzy, jsme připravili umělou larvální dietu, která obsahovala 5 nejhojnějších látek akumulovaných v určitém poměru v hemolymfě diapauzních, chladově aklimovaných larev *C. costata* (prolin, 313; trehalóza, 108; glutamin; 55; asparagin, 26; betain; 6,1 mmol.l<sup>-1</sup>). Pouhé tři dny krmení nediapauzních, v teple aklimovaných larev *C. costata* na této směsi vedly k tomu, že larvy dramaticky změny svůj fenotyp: z minimální tolerance promrznutí na perfektní toleranci promrznutí při -30°C, a dokonce přežití kryoprezervace v kapalném dusíku. Tím byly jednoznačně potvrzeny jak adaptivní význam, tak aplikační potenciál kryoprotektivní směsi *C. costata*. Krmení larev na dietách obohacených jednotlivými komponentami směsi ukázalo, že hlavními účinnými složkami jsou

prolin a trehalóza, přičemž jejich působení je synergické (jejich společný účinek je silnější než součet jednotlivých účinků).

Měření termálních vlastností směsi pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie jsme zjistili významné ovlivnění termálních vlastností roztoku: bod tání směsi je nižší než bod tání komponent, frakce vázané vody je vyšší a frakce ledu je naopak nižší u směsi než u komponent, je stimulován přechod do skelné fáze. Použití zobrazovací analytické metody MALDI-MSI odhalilo, že dvě nejvýznamnější komponenty směsi, prolin a trehalóza, se v průběhu pomalého inokulativního (tedy přirozeného) promrzání larev chovají odlišně. Před započítím mrznutí jsou obě látky kolokalizovány převážně v hemolymfě a v menším množství i ve tkáních. V průběhu mrznutí se ovšem obě látky od sebe jakoby oddělují. Trehalóza zůstává v hemolymfě a tkáních, ze kterých byla osmoticky odsáta část vody směrem ke krystalům ledu zformovaným v hemolymfě. Trehalóza pak v nepromraženém zbytkovém roztoku stimuluje skelný přechod, který pravděpodobně chrání nativní struktury proteinů a dalších makromolekulárních struktur tím, že je fixuje v amorfní matici skla. Prolin, díky své výjimečné rozpustnosti ve vodě, a to i za velmi nízkých teplot, pravděpodobně putuje spolu s osmoticky přesouvanou vodou z hemolymfy a tkání směrem k rostoucím ledovým krystalům v extracelulárním prostoru. Na hranici ledového krystalu a roztoku se pak molekuly vody připojují ke krystalické mřížce ledu a extrémně rozpustný prolin zůstává v hustém roztoku, kde vytváří tzv. viskoelastickou kapalinu (McLain a kol., 2007; Troitzsch a kol., 2008; de Molina a kol., 2017), která může mít vlastnosti podobnými NADES směsím. Tato kapalina může hypoteticky sloužit jako elastický štít chránící tkáň před mechanickým poškozením objemovými změnami při rychlé změně teploty při ponoření/vynoření do/z kapalného dusíku.

V paralelních studiích v naší laboratoři byla testována schopnost kryoprotektivních směsí a jejich komponent stabilizovat při mrazovém stresu proteiny, biologické membrány (Grgac a kol., 2022) a také celé orgány – mitochondrie (Štětina a kol., 2020). Již výše jsem uvedl, že akumulace kryoprotektantů, je jednou z velmi charakteristických odpovědí mnoha druhů hmyzu na sezónní chladovou aklimaci – byla pozorována doslova u stovek druhů (Salt, 1961; Sømme, 1982; Zachariassen, 1985; Lee, 2010). Kompatibilní osmolyty využívá také kryogenická praxe pro zvýšení viability buněk nebo embryí skladovaných v kapalném dusíku (Elliott a kol., 2017). Zároveň byly stabilizační schopnosti různých kompatibilních osmolytů vzhledem k proteinům a membránám již dříve podrobně studovány a potvrzeny v četných *in vitro* experimentech (Arakawa a Timasheff, 1982, 1985; Carpenter a Crowe, 1988; Storey a kol., 1991; Košťál a kol., 2016). Empirické výsledky *in vitro* testů byly navíc podpořeny teoretickými termodynamickými výpočty stability proteinové struktury v přítomnosti a nepřítomnosti kompatibilních osmolytů (Gekko a Timasheff, 1981; Arakawa a Timasheff, 1982, 1985; Kim a kol., 2018; Arsiccio a Pisano, 2017). Všechny tyto argumenty jsou natolik silné, že vedou mnohé autory k přímým (netestovaným) adaptivním interpretacím často pozorované sezónní akumulace kryoprotektantů. V literatuře o chladové odolnosti hmyzu se již pevně ustálila frekventovaná dvojice spojených hypotéz: (i) hlavními molekulárními příčinami poškození hmyzího organismu chladem, a zejména mrazovou dehydratací, jsou ireverzibilní denaturace proteinů a ztráta integrity biologických membrán a (ii) pozorovaná akumulace kompatibilních osmolytů je adaptivní odpovědí, která zajišťuje ochranu struktur proteinů a membrán před poškozujícími účinky chladu, a zejména mrazové dehydratace (Storey a Storey, 1988; Lee, 2010b; Teets a Denlinger, 2013; Toxopeus a Sinclair, 2018;

Rozsypal, 2022). Rozhodli jsme se tyto ustálené hypotézy empiricky testovat na našem modelu – larva *C. costata* (Grgac a kol., 2022).

Pokud je příčinou poškození a smrti při mrazové dehydrataci ireverzibilní denaturace proteinů, měli bychom u citlivých larev vystavených letálnímu promrznutí pozorovat ztráty enzymatických aktivit denaturovaných proteinů. Pokud je příčinou ztráta integrity membrán, měli bychom pozorovat zvýšení permeability plazmatické membrány pro jinak nepermeabilní látky, jako jsou barviva typu Trypan Blue. Tyto poměrně jednoduché, ale robustní testy vedly k překvapivým výsledkům. Žádný z celkem 7 různých enzymů nevykazoval úplnou ztrátu aktivity (denuraci) u citlivých larev vystavených letálnímu stresu. Ani k mrazu silně citlivý protein, soudě podle dřívějších výsledků *in vitro* experimentů (Tamiya a kol., 1985; Carpenter a Crowe, 1988), enzym laktát dehydrogenáza, *nebyl* inaktivován, pokud prodělal mrazový stres *in vivo*, tzn. ve svém přirozeném prostředí, v celé larvě. Stejný experiment, se stejným výsledkem, jsme provedli se dvěma dalšími druhy hmyzu, které jsou k chladu obecně silně citlivé: octomilka *D. melanogaster* a saranče *Locusta migratoria*. Naproti tomu, pokud jsme enzymy extrahovali z hmyzích tkání do slabého vodného pufru (20 mM imidazol) a vystavili jsme je stejnému promrznutí, ale nyní v situaci *in vitro*, všechny enzymy úplně ztratily svou aktivitu. Dále jsme přidávali různé kompatibilní osmolyty i další látky (včetně biologicky inertních látek HistoDenz a Ficoll) do *in vitro* roztoku a u všech látek jsme pozorovali, v souladu s teorií a dřívějšími *in vitro* experimenty, že chrání enzymy před ztrátou aktivity způsobenou mrazovým stresem. Jedinou výjimkou byla močovina, u které je dobře znám její denaturační účinek na strukturu proteinů. Ochranné účinky byly silné již při použití relativně nízkých koncentrací kompatibilních osmolytů (v řádu jednotek až desítek mM). Tyto výsledky ukázaly, jak dramatický rozdíl je mezi testy stability enzymů provedenými *in vitro* a *in vivo*. Přirozené *in vivo* prostředí enzymů je oproti *in vitro* roztoku silně zahuštěné – *molecular crowding* (Chebotareva a kol., 2004). Nejrůznější mikrosoluty a rovněž makromolekuly patrně dostatečně stabilizují enzymy a chrání je před denaturací chladem i mrazovou dehydratací, a to i v buňkách a tělních roztocích jinak k mrazu-citlivých organismů. Zpochybnili jsme tedy hypotézu, že poškození enzymů je příčinou poškození a mortality hmyzu vystaveného letální mrazové dehydrataci a že tedy adaptivním vysvětlením akumulace kryoprotektantů u hmyzu je ochrana enzymů před denaturací (Grgac a kol., 2022).

Testy propustnosti plazmatických membrán buněk tukového tělesa pro Trypan Blue naopak podpořily hypotézu o citlivosti biologických membrán k mrazovému stresu. Plazmatické membrány tukových buněk vystavených mrazovému stresu *in vitro* ztrácely svou integritu a propouštěli Trypan Blue ať už pocházely z citlivých nebo freeze-tolerantních fenotypů larev. Zjistili jsme, že kompatibilní osmolyty dobře chrání membrány před ztrátou integrity, ovšem pouze některé (prolin a trehalóza ano; ostatní komponenty kryoprotekticní směsi *C. costata* ne, nízkomolekulární biologicky inertní látka HistoDenz ne) a jen pokud jsou tyto přítomny v relativně vysokých koncentracích (odpovídajících koncentracím přirozeně akumulovaným diapauzními, chladově aklimovanými larvami). Dále jsme zjistili, že prolin a trehalóza působí synergicky, což dobře koresponduje s výsledky studie č. 3 (Moos a kol., 2022). Kromě kompatibilních osmolytů chránil membrány také protein BSA (Bovine Serum Albumin), ale již nikoli Ficoll (biologicky inertní makromolekula). Tyto výsledky naznačily, že biologické membrány mohou skutečně být primárním cílem poškození mrazovou dehydratací, a že adaptivním vysvětlením akumulace kryoprotektantů může být právě ochrana membrán před ztrátou regulované propustnosti (Grgac a kol., 2022).

## 6. Závěry

Globální transkriptomickou analýzou jsme odhalili procesy a geny, které doprovázejí chladovou aklimaci larev octomilky *C. costata* a mohou tedy být významné při rozvoji její extrémní tolerance vůči promrznutí včetně přežití v kapalném dusíku (publikace č. 1).

V genómu *C. costata* jsme našli a sekvenovali gen pravděpodobně kódující LEA3-like protein. Analýzy struktury proteinu a transkripčních profilů v odpovědi na aklimaci v suchu a chladu potvrdily shodu s jinými živočišnými LEA proteiny. Připravili jsme rekombinantní Ccos LEA3-like protein v bakteriálním expresním systému a rovněž funkční myší protilátku proti tomuto proteinu (dosud nepublikované výsledky).

Zjistili jsme, že aklimace v chladu a v suchu vedou k podobným změnám v metabolismu larev *C. costata* — tedy k akumulaci látek s potenciálně kryoprotektivními vlastnostmi, dále k akumulaci fosfagenů a zároveň k depleci produktů spotřeby chemické energie. Na základě výsledků jsme formulovali hypotézu, že metabolická suprese je společným základem pro akumulaci kompatibilních osmolytů, a akumulace může být v evoluci pozitivně selektována kvůli významu kompatibilních osmolytů pro ochranu buněk a makromolekul před účinky dehydratace (evaporační, mrazové, popřípadě obojí zároveň). Larvy aklimované v suchu sice nezískaly větší odolnost vůči suchu, ale vykazovaly významně vyšší chladovou a mrazovou odolnost.

Metabolickou analýzou jsme popsali detailní složení směsi látek které ve své hemolymfě a tkáních hromadí diapauzní a chladově aklimované larvy *C. costata*. Zjistili jsme, že hlavními kryoprotektivními složkami jsou prolin a trehalóza, které působí synergicky. Testovali jsme termální vlastnosti těchto směsí a sledovali jejich chování při pomalém inokulativním mražení larev. Tyto analýzy naznačily rozdíly mezi prolinem a trehalózou v mechanismu jejich kryoprotektivního působení — trehalóza stimuluje skelný přechod a prolin tvoří viskoelastickou kapalinu.



## 7. Reference

- Abba, S., Ghignone, S., & Bonfante, P. (2006). A dehydration-inducible gene in the truffle *Tuber borchii* identifies a novel group of dehydrins. *BMC genomics*, 7(1), 1-15.
- Allakhverdiev, S. I., Nishiyama, Y., Suzuki, I., Tasaka, Y., & Murata, N. (1999). Genetic engineering of the unsaturation of fatty acids in membrane lipids alters the tolerance of *Synechocystis* to salt stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(10), 5862-5867.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
- Anchordoguy, T. J., Rudolph, A. S., Carpenter, J. F., & Crowe, J. H. (1987). Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology*, 24(4), 324-331.
- Angell, C. A. (1982). *Water: a comprehensive treatise*. by F. Franks, Plenum, New York, 7, 1.
- Arakawa, T., & Timasheff, S. (1985). The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophysical journal*, 47(3), 411-414.
- Arakawa, T., & Timasheff, S. N. (1982). Stabilization of protein structure by sugars. *Biochemistry*, 21(25), 6536-6544.
- Arsiccio, A., & Pisano, R. (2017). Stability of proteins in carbohydrates and other additives during freezing: the human growth hormone as a case study. *The Journal of Physical Chemistry B*, 121(37), 8652-8660.
- Artus, N. N., Uemura, M., Steponkus, P. L., Gilmour, S. J., Lin, C., & Thomashow, M. F. (1996). Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana* COR15a gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(23), 13404-13409.
- Bahrndorff, S., Tunnaclyffe, A., Wise, M. J., McGee, B., Holmstrup, M., & Loeschcke, V. (2009). Bioinformatics and protein expression analyses implicate LEA proteins in the drought response of *Collembola*. *Journal of Insect Physiology*, 55(3), 210-217.
- Ball, P. (2008). Water as an active constituent in cell biology. *Chemical reviews*, 108(1), 74-108.
- Basden, E. B. (1954, September). Diapause in *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae). In *Proceedings of the Royal Entomological Society of London. Series A, General Entomology* (Vol. 29, No. 7-9, pp. 114-118). Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.
- Battista, J. R., Park, M. J., & McLemore, A. E. (2001). Inactivation of two homologues of proteins presumed to be involved in the desiccation tolerance of plants sensitizes *Deinococcus radiodurans* R1 to desiccation. *Cryobiology*, 43(2), 133-139.
- Benoit, J. B. (2010). Water management by dormant insects: comparisons between dehydration resistance during summer aestivation and winter diapause. *Aestivation*, 209-229.
- Benoit, J. B., Lopez-Martinez, G., Michaud, M. R., Elnitsky, M. A., Lee Jr, R. E., & Denlinger, D. L. (2007). Mechanisms to reduce dehydration stress in larvae of the Antarctic midge, *Belgica antarctica*. *Journal of Insect Physiology*, 53(7), 656-667.
- Block, W. (1991). To freeze or not to freeze? Invertebrate survival of sub-zero temperatures. *Functional Ecology*, 284-290.
- Block, W. (1996). Cold or drought-The lesser of two evils for terrestrial arthropods? *European Journal of Entomology*, 93, 325-340.
- Block, W. (2003). Water or ice? —the challenge for invertebrate cold survival. *Science progress*, 86(1-2), 77-101.

- Bolen, D. W., & Baskakov, I. V. (2001). The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. *Journal of molecular biology*, 310(5), 955-963.
- Bremer, A., Wolff, M., Thalhammer, A., & Hincha, D. K. (2017). Folding of intrinsically disordered plant LEA proteins is driven by glycerol-induced crowding and the presence of membranes. *The FEBS journal*, 284(6), 919-936.
- Brovchenko, I., & Oleinikova, A. (2008). Which properties of a spanning network of hydration water enable biological functions?. *ChemPhysChem*, 9(18), 2695-2702.
- Brown, A. D. (1978). Compatible solutes and extreme water stress in eukaryotic microorganisms. *Advances in microbial physiology*, 17, 181-242.
- Browne, J. A., Dolan, K. M., Tyson, T., Goyal, K., Tunnacliffe, A., & Burnell, A. M. (2004). Dehydration-specific induction of hydrophilic protein genes in the anhydrobiotic nematode *Aphelenchus avenae*. *Eukaryotic cell*, 3(4), 966-975.
- Bryant, G., Koster, K. L., & Wolfe, J. (2001). Membrane behaviour in seeds and other systems at low water content: the various effects of solutes. *Seed Science Research*, 11(1), 17-25.
- Bunning, E. (1958). *Fyziologické hodiny*. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer.
- Burdon, R. H. (1986). Heat shock and the heat shock proteins. *Biochemical Journal*, 240(2), 313.
- Capicciotti, C. J., Doshi, M., & Ben, R. N. (2013). Ice recrystallization inhibitors: from biological antifreezes to small molecules. *Recent developments in the study of recrystallization*, 177, 224.
- Carpenter, J. F., & Crowe, J. H. (1988). The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. *Cryobiology*, 25(3), 244-255.
- Castro, V. I., Craveiro, R., Silva, J. M., Reis, R. L., Paiva, A., & Duarte, A. R. C. (2018). Natural deep eutectic systems as alternative nontoxic cryoprotective agents. *Cryobiology*, 83, 15-26.
- Cesaro, A., De Giacomo, O., & Sussich, F. (2008). Water interplay in trehalose polymorphism. *Food Chemistry*, 106(4), 1318-1328.
- Chapman, D. (1975). Phase transitions and fluidity characteristics of lipids and cell membranes. *Quarterly reviews of biophysics*, 8(2), 185-235.
- Chebotareva, N. A., Kurganov, B. I., & Livanova, N. B. (2004). Biochemical effects of molecular crowding. *Biochemistry (Moscow)*, 69(11), 1239-1251.
- Chen, T., Fowler, A., & Toner, M. (2000). Literature review: supplemented phase diagram of the trehalose–water binary mixture. *Cryobiology*, 40(3), 277-282.
- Choi, Y. H., van Spronsen, J., Dai, Y., Verberne, M., Hollmann, F., Arends, I. W., ... & Verpoorte, R. (2011). Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant physiology*, 156(4), 1701-1705.
- Clark, M. S., Thorne, M. A., Purać, J., Grubor-Lajšić, G., Kube, M., Reinhardt, R., & Worland, M. R. (2007). Surviving extreme polar winters by desiccation: clues from Arctic springtail (*Onychiurus arcticus*) EST libraries. *BMC genomics*, 8(1), 1-12.
- Clegg, J. S., Seitz, P., Seitz, W., & Hazlewood, C. F. (1982). Cellular responses to extreme water loss: the water-replacement hypothesis. *Cryobiology*, 19(3), 306-316.
- Close, T. J., & Lammers, P. J. (1993). An osmotic stress protein of cyanobacteria is immunologically related to plant dehydrins. *Plant Physiology*, 101(3), 773-779.
- Colinet, H., Lee, S. F., & Hoffmann, A. (2010a). Temporal expression of heat shock genes during cold stress and recovery from chill coma in adult *Drosophila melanogaster*. *The FEBS journal*, 277(1), 174-185.

- Colinet, H., Lee, S. F., & Hoffmann, A. (2010b). Knocking down expression of Hsp22 and Hsp23 by RNA interference affects recovery from chill coma in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 213(24), 4146-4150.
- Cossins, A. R. (1994). *Temperature adaptation of biological membranes*. Portland Press.
- Cossins, A. R. (1998). Life on the edge: Amazing creatures thriving in extreme environments. *Nature*, 393(6682), 227-228.
- Cossins, A. R., & Macdonald, A. G. (1989). The adaptation of biological membranes to temperature and pressure: fish from the deep and cold. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 21(1), 115-135.
- Crowe, J. H. (2007). Trehalose as a "chemical chaperone". *Molecular aspects of the stress response: chaperones, membranes, and networks*, 143-158.
- Crowe, J. H., Carpenter, J. F., & Crowe, L. M. (1998). The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual review of physiology*, 60(1), 73-103.
- Crowe, J. H., Crowe, L. M., Oliver, A. E., Tsvetkova, N., Wolkers, W., & Tablin, F. (2001). The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology*, 43(2), 89-105.
- Crowe, J. H., Hoekstra, F. A., & Crowe, L. M. (1992). Anhydrobiosis. *Annual review of physiology*, 54(1), 579-599.
- Crowe, L. M., Mouradian, R., Crowe, J. H., Jackson, S. A., & Womersley, C. (1984). Effects of carbohydrates on membrane stability at low water activities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 769(1), 141-150.
- Dai, Y., Van Spronsen, J., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2013). Ionic liquids and deep eutectic solvents in natural products research: mixtures of solids as extraction solvents. *Journal of natural products*, 76(11), 2162-2173.
- Dai, Y., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2015). Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. *Food chemistry*, 187, 14-19.
- Danks, H. V. (1987). *Insect dormancy: an ecological perspective*. Biological Survey of Canada (Terrestrial Arthropods).
- Danks, H. V. (2000). Dehydration in dormant insects. *Journal of Insect Physiology*, 46(6), 837-852.
- Das, U., Hariprasad, G., Ethayathulla, A. S., Manral, P., Das, T. K., Pasha, S., ... & Srinivasan, A. (2007). Inhibition of protein aggregation: supramolecular assemblies of arginine hold the key. *PloS one*, 2(11), e1176.
- De Molina, P. M., Alvarez, F., Frick, B., Wildes, A., Arbe, A., & Colmenero, J. (2017). Investigation of the dynamics of aqueous proline solutions using neutron scattering and molecular dynamics simulations. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19(40), 27739-27754.
- Denekamp, N. Y., Reinhardt, R., Kube, M., & Lubzens, E. (2010). Late embryogenesis abundant (LEA) proteins in nondesiccated, encysted, and diapausing embryos of rotifers. *Biology of reproduction*, 82(4), 714-724.
- Denlinger, D. L. (1991). Relationship between cold hardiness and diapause. In *Insects at low temperature* (pp. 174-198). Springer, Boston, MA.
- Denlinger, D. L. (2002). Regulation of diapause. *Annual review of entomology*, 47, 93.
- Des Marteaux, L. E., Štětina, T., & Košťál, V. (2018b). Insect fat body cell morphology and response to cold stress is modulated by acclimation. *Journal of Experimental Biology*, 221(21), jeb189647.

- Des Marteaux, L. E., Stinziano, J. R., & Sinclair, B. J. (2018a). Effects of cold acclimation on rectal macromorphology, ultrastructure, and cytoskeletal stability in *Gryllus pennsylvanicus* crickets. *Journal of insect physiology*, 104, 15-24.
- Dias, C. L., Ala-Nissila, T., Wong-Ekkabut, J., Vattulainen, I., Grant, M., & Karttunen, M. (2010). The hydrophobic effect and its role in cold denaturation. *Cryobiology*, 60(1), 91-99.
- Duman, J. G. (2001). Antifreeze and ice nucleator proteins in terrestrial arthropods. *Annual Review of Physiology*, 63, 327.
- Duman, J. G. (2015). Animal ice-binding (antifreeze) proteins and glycolipids: an overview with emphasis on physiological function. *The Journal of experimental biology*, 218(12), 1846-1855.
- Duman, J. G., Walters, K. R., Sformo, T., Carrasco, M. A., Nickell, P. K., Lin, X., & Barnes, B. M. (2010). Antifreeze and ice-nucleator proteins. *Low temperature biology of insects*, 59-90.
- Dure III, L. (2001). Occurrence of a repeating 11-mer amino acid sequence motif in diverse organisms. *Protein and Peptide Letters*, 8(2), 115-122.
- Dure III, L., Greenway, S. C., & Galau, G. A. (1981). Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by in vitro and in vivo protein synthesis. *Biochemistry*, 20(14), 4162-4168.
- Elliott, G. D., Wang, S., & Fuller, B. J. (2017). Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryobiology*, 76, 74-91.
- Elnitsky, M. A., Hayward, S. A., Rinehart, J. P., Denlinger, D. L., & Lee Jr, R. E. (2008). Cryoprotective dehydration and the resistance to inoculative freezing in the Antarctic midge, *Belgica antarctica*. *Journal of Experimental Biology*, 211(4), 524-530.
- Emerson, K. J., Bradshaw, W. E., & Holzapfel, C. M. (2010). Microarrays reveal early transcriptional events during the termination of larval diapause in natural populations of the mosquito, *Wyeomyia smithii*. *PLoS One*, 5(3), e9574.
- Enomoto, O. (1982). Larval diapause in *Chymomyza costata* (Diptera: Drosophilidae) I. Effects of temperature and photoperiod on the development. *Low temperature science. Ser. B, Biological sciences*, 39, 21-29.
- Fahy, G. M., & Wowk, B. (2015). Principles of cryopreservation by vitrification. *Cryopreservation and freeze-drying protocols*, 21-82.
- Feder, M. E., & Walser, J. C. (2005). The biological limitations of transcriptomics in elucidating stress and stress responses. *Journal of evolutionary biology*, 18(4), 901-910.
- Förster, F., Liang, C., Shkumatov, A., Beisser, D., Engelmann, J. C., Schnölzer, M., ... & Dandekar, T. (2009). Tardigrade workbench: comparing stress-related proteins, sequence-similar and functional protein clusters as well as RNA elements in tardigrades. *BMC genomics*, 10(1), 1-10.
- Franks, F., & Hatley, R. H. (1991). Stability of proteins at subzero temperatures: thermodynamics and some ecological consequences. *Pure and applied chemistry*, 63(10), 1367-1380.
- Galau, G. A., Hughes, D. W., & Dure, L. (1986). Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (Lea) mRNAs. *Plant molecular biology*, 7(3), 155-170.
- Gehrken, U. (1984). Winter survival of an adult bark beetle *Ips acuminatus* Gyll. *Journal of insect physiology*, 30(5), 421-429.
- Gekko, K., & Timasheff, S. N. (1981). Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures. *Biochemistry*, 20(16), 4667-4676.

- Gertrudes, A., Craveiro, R., Eltayari, Z., Reis, R. L., Paiva, A., & Duarte, A. R. C. (2017). How do animals survive extreme temperature amplitudes? The role of natural deep eutectic solvents. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(11), 9542-9553.
- Goto, S. G., & Kimura, M. T. (1998). Heat-and cold-shock responses and temperature adaptations in subtropical and temperate species of *Drosophila*. *Journal of insect Physiology*, 44(12), 1233-1239.
- Goyal, K., Tisi, L., Basran, A., Browne, J., Burnell, A., Zurdo, J., & Tunnacliffe, A. (2003). Transition from natively unfolded to folded state induced by desiccation in an anhydrobiotic nematode protein. *Journal of Biological Chemistry*, 278(15), 12977-12984.
- Goyal, K., Walton, L. J., & Tunnacliffe, A. (2005). LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochemical journal*, 388(1), 151-157.
- Grgac, R., Rozsypal, J., Des Marteaux, L., Štětina, T., & Košťál, V. (2022). Stabilization of insect cell membranes and soluble enzymes by accumulated cryoprotectants during freezing stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(41), e2211744119.
- Hackman, W., Lakovaara, S., Saura, A., Sorsa, M. A. R. J. A., & Vepsäläinen, K. (1970). On the biology and karyology of *Chymomyza costata* Zetterstedt, with reference to the taxonomy and distribution of various species of *Chymomyza* (Dipt., *Drosophilidae*). In *Annales Entomologici Fennici* (Vol. 36, pp. 1-9).
- Hahn, D. A., & Denlinger, D. L. (2007). Meeting the energetic demands of insect diapause: nutrient storage and utilization. *Journal of insect physiology*, 53(8), 760-773.
- Hand, S. C., Menze, M. A., Toner, M., Boswell, L., & Moore, D. (2011). LEA proteins during water stress: not just for plants anymore. *Annual Reviews of Physiology*, 115.
- Haslbeck, M., & Vierling, E. (2015). A first line of stress defense: small heat shock proteins and their function in protein homeostasis. *Journal of molecular biology*, 427(7), 1537-1548.
- Hazel, J. R. (1989). Cold adaptation in ectotherms: regulation of membrane function and cellular metabolism. In *Animal adaptation to cold* (pp. 1-50). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Hazel, J. R. (1995). Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? *Annual review of physiology*, 57(1), 19-42.
- Hazel, J. R. (1997). Thermal adaptation in biological membranes: beyond homeoviscous adaptation. In *Advances in molecular and cell biology* (Vol. 19, pp. 57-101). Elsevier.
- Hodkova, M., Berkova, P., & Zahradníčková, H. (2002). Photoperiodic regulation of the phospholipid molecular species composition in thoracic muscles and fat body of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera) via an endocrine gland, corpus allatum. *Journal of Insect Physiology*, 48(11), 1009-1019.
- Hoekstra, F. A., Golovina, E. A., & Buitink, J. (2001a). Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in plant science*, 6(9), 431-438.
- Hoekstra, F. A., Golovina, E. A., Tetteroo, F. A., & Wolkers, W. F. (2001b). Induction of desiccation tolerance in plant somatic embryos: how exclusive is the protective role of sugars? *Cryobiology*, 43(2), 140-150.
- Holmstrup, M., & Westh, P. (1994). Dehydration of earthworm cocoons exposed to cold: a novel cold hardiness mechanism. *Journal of Comparative Physiology B*, 164(4), 312-315.
- Holmstrup, M., Bayley, M., & Ramløv, H. (2002). Supercool or dehydrate? An experimental analysis of overwintering strategies in small permeable arctic invertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(8), 5716-5720.

- Hornberger, K., Li, R., Duarte, A. R. C., & Hubel, A. (2021). Natural deep eutectic systems for nature-inspired cryopreservation of cells. *AIChE Journal*, 67(2), e17085.
- Inoue, H., & Timasheff, S. N. (1972). Preferential and absolute interactions of solvent components with proteins in mixed solvent systems. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 11(4), 737-743.
- Janis, B., Belott, C., & Menze, M. A. (2018). Role of intrinsic disorder in animal desiccation tolerance. *Proteomics*, 18(21-22), 1800067.
- Janis, B., Belott, C., Brockman, T., & Menze, M. A. (2022). Functional and Conformational Plasticity of an Animal Group 1 LEA Protein. *Biomolecules*, 12(3), 425.
- Jensen, M. Ø., Mouritsen, O. G., & Peters, G. H. (2004). The hydrophobic effect: Molecular dynamics simulations of water confined between extended hydrophobic and hydrophilic surfaces. *The Journal of chemical physics*, 120(20), 9729-9744.
- Joanisse, D., & Storey, K. (1996). Oxidative stress and antioxidants in overwintering larvae of cold-hardy goldenrod gall insects. *The Journal of experimental biology*, 199(7), 1483-1491.
- Jovanović-Galović, A., Blagojević, D. P., Grubor-Lajšić, G., Worland, M. R., & Spasić, M. B. (2007). Antioxidant defense in mitochondria during diapause and postdiapause development of European corn borer (*Ostrinia nubilalis*, Hubn.). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 64(3), 111-119.
- Kankare, M., Salminen, T., Laiho, A., Vesala, L., & Hoikkala, A. (2010). Changes in gene expression linked with adult reproductive diapause in a northern malt fly species: a candidate gene microarray study. *BMC ecology*, 10(1), 1-9.
- Kaul, S., Sharma, S. S., & Mehta, I. K. (2008). Free radical scavenging potential of L-proline: evidence from in vitro assays. *Amino acids*, 34(2), 315-320.
- Kaushik, J. K., & Bhat, R. (2003). Why Is Trehalose an Exceptional Protein Stabilizer?: An analysis of the thermal stability of proteins in the presence of the compatible osmolyte trehalose. *Journal of Biological Chemistry*, 278(29), 26458-26465.
- Kiang, J. G., & Tsokos, G. C. (1998). Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacology & therapeutics*, 80(2), 183-201.
- Kikawada, T., Nakahara, Y., Kanamori, Y., Iwata, K. I., Watanabe, M., McGee, B., ... & Okuda, T. (2006). Dehydration-induced expression of LEA proteins in an anhydrobiotic chironomid. *Biochemical and biophysical research communications*, 348(1), 56-61.
- Kim, B. Y., Wang, J. R., Miller, D. E., Barmina, O., Delaney, E., Thompson, A., ... & Petrov, D. A. (2021). Highly contiguous assemblies of 101 drosophilid genomes. *Elife*, 10, e66405.
- Kim, N. A., Thapa, R., & Jeong, S. H. (2018). Preferential exclusion mechanism by carbohydrates on protein stabilization using thermodynamic evaluation. *International journal of biological macromolecules*, 109, 311-322.
- King, A. M., & MacRae, T. H. (2015). Insect heat shock proteins during stress and diapause. *Annu. Rev. Entomol*, 60, 59-75.
- Kobelková, A., Bajgar, A., & Dolezel, D. (2010). Functional molecular analysis of a circadian clock gene timeless promoter from the Drosophilid fly *Chymomyza costata*. *Journal of biological rhythms*, 25(6), 399-409.
- Korsloot, A., van Gestel, C. A., & Van Straalen, N. M. (2004). *Environmental stress and cellular response in arthropods*. CRC press.
- Košťál, V. (2010). Cell structural modifications in insects at low temperature. *Low temperature biology of insects*, 116-140.

- Koštál, V. (2011). Insect photoperiodic calendar and circadian clock: independence, cooperation, or unity? *Journal of insect physiology*, 57(5), 538-556.
- Koštál, V., & Shimada, K. (2001). Malfunction of circadian clock in the non-photoperiodic-diapause mutants of the drosophilid fly, *Chymomyza costata*. *Journal of Insect Physiology*, 47(11), 1269-1274.
- Koštál, V., & Tollarova-Borovanska, M. (2009). The 70 kDa heat shock protein assists during the repair of chilling injury in the insect, *Pyrrhocoris apterus*. *PloS one*, 4(2), e4546.
- Koštál, V., Korbelová, J., Rozsypal, J., Zahradníčková, H., Cimlová, J., Tomčala, A., & Šimek, P. (2011a). Long-term cold acclimation extends survival time at 0 C and modifies the metabolomic profiles of the larvae of the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *PLoS One*, 6(9), e25025.
- Koštál, V., Mollaei, M., & Schöttner, K. (2016). Diapause induction as an interplay between seasonal token stimuli and modifying and directly limiting factors: hibernation in *Chymomyza costata*. *Physiological Entomology*, 41(4), 344-357.
- Koštál, V., Noguchi, H., Shimada, K., & Hayakawa, Y. (2000). Circadian component influences the photoperiodic induction of diapause in a drosophilid fly, *Chymomyza costata*. *Journal of Insect Physiology*, 46(6), 887-896.
- Koštál, V., Šimek, P., Zahradníčková, H., Cimlová, J., & Štětina, T. (2012). Conversion of the chill susceptible fruit fly larva (*Drosophila melanogaster*) to a freeze tolerant organism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(9), 3270-3274.
- Koštál, V., Štětina, T., Poupardin, R., Korbelová, J., & Bruce, A. W. (2017). Conceptual framework of the eco-physiological phases of insect diapause development justified by transcriptomic profiling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(32), 8532-8537.
- Koštál, V., Yanagimoto, M., & Bastl, J. (2006). Chilling-injury and disturbance of ion homeostasis in the coxal muscle of the tropical cockroach (*Nauphoeta cinerea*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 143(2), 171-179.
- Koštál, V., Zahradníčková, H., & Šimek, P. (2011b). Hyperprolinemic larvae of the drosophilid fly, *Chymomyza costata*, survive cryopreservation in liquid nitrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(32), 13041-13046.
- Kučera, L., Moos, M., Štětina, T., Korbelová, J., Vodrážka, P., Des Marteaux, L., ... & Košťál, V. (2022). A mixture of innate cryoprotectants is key for freeze tolerance and cryopreservation of a drosophilid fly larva. *Journal of Experimental Biology*, 225(8), jeb243934.
- Kyte, J., & Doolittle, R. I. (1982). I. *Mol. Biol.*, 157, 105-132.
- Lakovaara, S., Saura, A., Koref-Santibanez, S. U. S. I., & Ehrman, L. E. E. (1972). Aspects of diapause and its genetics in northern drosophilids. *Hereditas*, 70(1), 89-96.
- Lalouette, L., Williams, C. M., Hervant, F., Sinclair, B. J., & Renault, D. (2011). Metabolic rate and oxidative stress in insects exposed to low temperature thermal fluctuations. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 158(2), 229-234.
- Lange, C., & Rudolph, R. (2009). Suppression of protein aggregation by L-arginine. *Current pharmaceutical biotechnology*, 10(4), 408-414.
- Lankinen, P., & Riihimaa, A. (1997). Effects of temperature on weak circadian eclosion rhythmicity in *Chymomyza costata* (Diptera: Drosophilidae). *Journal of insect physiology*, 43(3), 251-260.
- Lee Jr, R. E. (2010a). Rapid cold-hardening: ecological significance and underpinning mechanisms. *Low temperature biology of insects*, 35-58.
- Lee Jr, R. E. (2010b). A primer on insect cold-tolerance. *Low Temperature Biology of Insects*, 3-35.

- Lees, A. D. (1955). The physiology of diapause in arthropods. *Cambridge Monographs Experimental Biology*, 4, 1-151.
- Levis, N. A., Yi, S. X., & Lee Jr, R. E. (2012). Mild desiccation rapidly increases freeze tolerance of the goldenrod gall fly, *Eurosta solidaginis*: evidence for drought-induced rapid cold-hardening. *Journal of Experimental Biology*, 215(21), 3768-3773.
- Li, D., & He, X. (2009). Desiccation induced structural alterations in a 66-amino acid fragment of an anhydrobiotic nematode late embryogenesis abundant (LEA) protein. *Biomacromolecules*, 10(6), 1469-1477.
- Li, L., Zhou, X., Chen, Z., Cao, Y., & Zhao, G. (2022). The group 3 LEA protein of *Artemia franciscana* for cryopreservation. *Cryobiology*.
- Li, S., Wang, G., Lin, H., & Huang, C. H. (1998). Calorimetric Studies of Phosphatidylethanolamines with Saturated sn-1 and Dioic sn-2 Acyl Chains. *Journal of Biological Chemistry*, 273(30), 19009-19018.
- Lindquist, S., & Craig, E. A. (1988). The heat-shock proteins. *Annual review of genetics*, 22(1), 631-677.
- Liu, W., Huang, Z., He, X., Jiang, P., Huo, X., Lu, Z., & Liu, B. (2020). Impacts of trehalose and l-proline on the thermodynamic nonequilibrium phase change and thermal properties of normal saline. *Cryobiology*, 96, 92-98.
- Liu, Y., Friesen, J. B., McAlpine, J. B., Lankin, D. C., Chen, S. N., & Pauli, G. F. (2018). Natural deep eutectic solvents: properties, applications, and perspectives. *Journal of natural products*, 81(3), 679-690.
- Lovelock, J. E. (1954). The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing. *Biochemical Journal*, 56(2), 265.
- Lubawy, J., Daburon, V., Chowański, S., Słocińska, M., & Colinet, H. (2019). Thermal stress causes DNA damage and mortality in a tropical insect. *Journal of Experimental Biology*, 222(23), jeb213744.
- Lumme, J. (1978). Phenology of boreal drosophilids (Diptera).
- Lundheim, R. (2002). Physiological and ecological significance of biological ice nucleators. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 357(1423), 937-943.
- Ma, X., Jamil, K., MacRae, T. H., Clegg, J. S., Russell, J. M., Villeneuve, T. S., ... & Oliver, A. E. (2005). A small stress protein acts synergistically with trehalose to confer desiccation tolerance on mammalian cells. *Cryobiology*, 51(1), 15-28.
- MacMillan, H. A. (2019). Dissecting cause from consequence: a systematic approach to thermal limits. *Journal of Experimental Biology*, 222(4), jeb191593.
- MacRae, T. H. (2010). Gene expression, metabolic regulation and stress tolerance during diapause. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(14), 2405-2424.
- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American journal of physiology-cell physiology*, 247(3), C125-C142.
- McElhaney, R. N. (1984). The relationship between membrane lipid fluidity and phase state and the ability of bacteria and mycoplasmas to grow and survive at various temperatures. In *Membrane fluidity* (pp. 249-278). Springer, Boston, MA.
- McLain, S. E., Soper, A. K., Terry, A. E., & Watts, A. (2007). Structure and hydration of L-proline in aqueous solutions. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111(17), 4568-4580.



- Menze, M. A., Boswell, L., Toner, M., & Hand, S. C. (2009). Occurrence of mitochondria-targeted late embryogenesis abundant (LEA) gene in animals increases organelle resistance to water stress. *Journal of Biological Chemistry*, 284(16), 10714-10719.
- Meryman, H. T. (1971). Osmotic stress as a mechanism of freezing injury. *Cryobiology*, 8(5), 489-500.
- Miquel, M., McConn, M., & Wu, J. (1994). Arabidopsis mutants and genetic approaches to the control of lipid composition. In *Temperature Adaptations of Biological Membranes* (pp. 141-154). Portland Press London and Chapel Hill.
- Moon, I., Fujikawa, S., & Shimada, K. (1996). Cryopreservation of Chymomyza larvae (Diptera: Drosophilidae) at -196 degrees C with extracellular freezing. *Cryo-letters*.
- Moore, D. S., & Hand, S. C. (2016). Cryopreservation of lipid bilayers by LEA proteins from *Artemia franciscana* and trehalose. *Cryobiology*, 73(2), 240-247.
- Moos, M., Korbelová, J., Štětina, T., Opekar, S., Šimek, P., Grgac, R., & Košťál, V. (2022). Cryoprotective metabolites are sourced from both external diet and internal macromolecular reserves during metabolic reprogramming for freeze tolerance in drosophilid fly, *Chymomyza costata*. *Metabolites*, 12(2), 163.
- Morrow, G., Heikkila, 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*, 11(1), 51.
- Morrow, G., Inaguma, Y., Kato, K., & Tanguay, R. M. (2000). The small heat shock protein Hsp22 of *Drosophila melanogaster* is a mitochondrial protein displaying oligomeric organization. *Journal of Biological Chemistry*, 275(40), 31204-31210.
- Muldrew, K., Acker, J. P., Elliott, J. A., & McGann, L. E. (2004). The water to ice transition: implications for living cells. In *Life in the frozen state* (pp. 93-134). CRC Press.
- Murata, N., & Yamaya, J. (1984). Temperature-dependent phase behavior of phosphatidylglycerols from chilling-sensitive and chilling-resistant plants. *Plant Physiology*, 74(4), 1016-1024.
- Murray, P., Hayward, S. A., Govan, G. G., Gracey, A. Y., & Cossins, A. R. (2007). An explicit test of the phospholipid saturation hypothesis of acquired cold tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(13), 5489-5494.
- Nakayama, K., Okawa, K., Kakizaki, T., & Inaba, T. (2008). Evaluation of the protective activities of a late embryogenesis abundant (LEA) related protein, Cor15am, during various stresses in vitro. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 0805210897-0805210897.
- Nakayama, K., Okawa, K., Kakizaki, T., Honma, T., Itoh, H., & Inaba, T. (2007). Arabidopsis Cor15am is a chloroplast stromal protein that has cryoprotective activity and forms oligomers. *Plant physiology*, 144(1), 513-523.
- 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. *Journal of insect physiology*, 51(12), 1320-1329. "
- Nozawa, Y., Iida, H., Fukushima, H., Oki, K., & Onishi, S. (1974). Studies on *Tetrahymena* membranes: temperature-induced alterations in fatty acid composition of various membrane fractions in *Tetrahymena pyriformis* and its effect on membrane fluidity as inferred by spin-label study. *Biochimica et biophysica acta*, 367(2), 134-147.
- Numata, H., Shiga, S., & Morita, A. (1997). Photoperiodic receptors in arthropods. *Zoological Science*, 14(2), 187-197.
- Olgenblum, G. I., Sapir, L., & Harries, D. (2020). Properties of aqueous trehalose mixtures: glass transition and hydrogen bonding. *Journal of chemical theory and computation*, 16(2), 1249-1262.

- Overgaard, J., Tomčala, A., Sørensen, J. G., Holmstrup, M., Krogh, P. H., Šimek, P., & Košťál, V. (2008). Effects of acclimation temperature on thermal tolerance and membrane phospholipid composition in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Journal of insect physiology*, *54*(3), 619-629.
- Parcellier, A., Gurbuxani, S., Schmitt, E., Solary, E., & Garrido, C. (2003). Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochemical and biophysical research communications*, *304*(3), 505-512.
- Pavelka, J., Shimada, K., & Kostal, V. (2003). TIMELESS: a link between fly's circadian and photoperiodic clocks?. *European Journal of Entomology*, *100*(2), 255-266.
- Phang, J. M., Liu, W., Hancock, C. N., & Fischer, J. W. (2015). Proline metabolism and cancer: emerging links to glutamine and collagen. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, *18*(1), 71.
- Pittendrigh, C. S. (1960, January). Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 25, pp. 159-184). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Plesofsky-Vig, N. (1996). The heat shock proteins and the stress response. In *Biochemistry and molecular biology* (pp. 171-190). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Poelchau, M. F., Reynolds, J. A., Elsik, C. G., Denlinger, D. L., & Armbruster, P. A. (2013). Deep sequencing reveals complex mechanisms of diapause preparation in the invasive mosquito, *Aedes albopictus*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *280*(1759), 20130143.
- Pörtner, H. O. (2002). Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *132*(4), 739-761.
- Pouchkina-Stantcheva, N. N., McGee, B. M., Boschetti, C., Tolleter, D., Chakrabortee, S., Popova, A. V., ... & Tunnacliffe, A. (2007). Functional divergence of former alleles in an ancient asexual invertebrate. *Science*, *318*(5848), 268-271.
- Poupardin, R., Schöttner, K., Korbelová, J., Provazník, J., Doležel, D., Pavlinic, D., ... & Košťál, V. (2015). Early transcriptional events linked to induction of diapause revealed by RNAseq in larvae of drosophilid fly, *Chymomyza costata*. *BMC genomics*, *16*(1), 1-19.
- Powell, D., Sato, J. D., Brock, H. W., & Roberts, D. B. (1984). Regulation of synthesis of the larval serum proteins of *Drosophila melanogaster*. *Developmental biology*, *102*(1), 206-215.
- Privalov, P. L. (1990). Cold denaturation of protein. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, *25*(4), 281-306.
- Pruitt, N. L., & Lu, C. (2008). Seasonal changes in phospholipid class and class-specific fatty acid composition associated with the onset of freeze tolerance in third-instar larvae of *Eurosta solidaginis*. *Physiological and Biochemical Zoology*, *81*(2), 226-234.
- Pullin, A. S. (1996). Physiological relationships between insect diapause and cold tolerance: Coevolution or coincidence. *European Journal of Entomology*, *93*, 121-130.
- Qiu, J., Huang, H., He, H., Liu, H., Hu, S., Han, J., ... & Wang, P. (2019). Solubility behavior and data modeling of L-proline in different neat and binary solvent systems. *Journal of Chemical & Engineering Data*, *64*(12), 5920-5928.
- Ragland, G. J., Denlinger, D. L., & Hahn, D. A. (2010). Mechanisms of suspended animation are revealed by transcript profiling of diapause in the flesh fly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(33), 14909-14914.
- Rasmussen, P. H., Jørgensen, B., & Nielsen, J. (1997). Aqueous solutions of proline and NaCl studied by differential scanning calorimetry at subzero temperatures. *Thermochimica acta*, *303*(1), 23-30.

- Renault, D., Salin, C., Vannier, G., & Vernon, P. (2002). Survival at low temperatures in insects: what is the ecological significance of the supercooling point?. *CryoLetters*, 23(4), 217-228.
- Reyes, J. L., Campos, F., Wei, H. U. I., Arora, R., Yang, Y., Karlson, D. T., & Covarrubias, A. A. (2008). Functional dissection of hydrophilins during in vitro freeze protection. *Plant, cell & environment*, 31(12), 1781-1790.
- Reyes-DelaTorre, A., Peña-Rangel, M. T., & Riesgo-Escovar, J. R. (2012). Carbohydrate metabolism in *Drosophila*: reliance on the disaccharide trehalose. *Carbohydrates-comprehensive studies on glycobiology and glycotecnology*. Winchester: InTech, 317-38.
- Riihimaa, A. J., & Kimura, M. T. (1988). A mutant strain of *Chymomyza costata* (Diptera: Drosophilidae) insensitive to diapause-inducing action of photoperiod. *Physiological Entomology*, 13(4), 441-445.
- Riihimaa, A. J., & Kimura, M. T. (1989). Genetics of the photoperiodic larval diapause in *Chymomyza costata* (Diptera; Drosophilidae). *Hereditas*, 110(3), 193-200.
- Rinehart, J. P., Cakra-Ireland, R. A., Flannagan, R. D., & Denlinger, D. L. (2001). Expression of ecdysone receptor is unaffected by pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, while its dimerization partner, USP, is downregulated. *Journal of Insect Physiology*, 47(8), 915-921.
- Rinehart, J. P., Hayward, S. A., Elnitsky, M. A., Sandro, L. H., Lee Jr, R. E., & Denlinger, D. L. (2006). Continuous up-regulation of heat shock proteins in larvae, but not adults, of a polar insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(38), 14223-14227.
- Rinehart, J. P., Li, A., Yocum, G. D., Robich, R. M., Hayward, S. A., & Denlinger, D. L. (2007). Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insect diapause. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(27), 11130-11137.
- Ring, R. (1994). Desiccation and cryoprotection: overlapping adaptations. *Cryo-letters*, 15, 181-190.
- Ring, R. A. (1998). The role of trehalose in cold-hardiness and desiccation. *CryoLetters*, 19, 275-282.
- Rivera-Najera, L. Y., Saab-Rincón, G., Battaglia, M., Amero, C., Pulido, N. O., García-Hernández, E., ... & Covarrubias, A. A. (2014). A group 6 late embryogenesis abundant protein from common bean is a disordered protein with extended helical structure and oligomer-forming properties. *Journal of Biological Chemistry*, 289(46), 31995-32009.
- Roberts, J. K., DeSimone, N. A., Lingle, W. L., & Dure 3rd, L. (1993). Cellular concentrations and uniformity of cell-type accumulation of two lea proteins in cotton embryos. *The Plant Cell*, 5(7), 769-780.
- Rojas, R. R., & Leopold, R. A. (1996). Chilling injury in the housefly: evidence for the role of oxidative stress between pupariation and emergence. *Cryobiology*, 33(4), 447-458.
- Rozsypal, J. (2022). Cold and freezing injury in insects: An overview of molecular mechanisms. *EJE*, 119(1), 43-57.
- Rozsypal, J., & Košťál, V. (2018). Supercooling and freezing as eco-physiological alternatives rather than mutually exclusive strategies: A case study in *Pyrrhocoris apterus*. *Journal of insect physiology*, 111, 53-62.
- Rozsypal, J., Moos, M., Šimek, P., & Košťál, V. (2018). Thermal analysis of ice and glass transitions in insects that do and do not survive freezing. *Journal of Experimental Biology*, 221(7), jeb170464.
- Rudolph, A. S., & Crowe, J. H. (1986). A calorimetric and infrared spectroscopic study of the stabilizing solute proline. *Biophysical journal*, 50(3), 423-430.
- Russo, C. (1983). Purification of IgG monoclonal antibody by caprylic acid precipitation. *J. Immunol. Methods*, 65, 269.

- Russotti, G., Campbell, J., Toner, M., & Yarmush, M. L. (1997). Studies of heat and PGA1-induced cold tolerance show that HSP27 may help preserve actin morphology during hypothermia. *Tissue Engineering*, 3(2), 135-147.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.
- Sales, K., Brandt, W., Rumbak, E., & Lindsey, G. (2000). The LEA-like protein HSP 12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes*, 1463(2), 267-278.
- Salt, R. W. (1961). Principles of insect cold-hardiness. *Annual review of entomology*, 6(1), 55-74.
- Samuel, D., Kumar, T. K. S., Jayaraman, G., Yang, P. W., & Yu, C. (1997). Proline is a protein solubilizing solute. *IUBMB Life*, 41(2), 235-242.
- Sanfelice, D., & Temussi, P. A. (2016). Cold denaturation as a tool to measure protein stability. *Biophysical chemistry*, 208, 4-8.
- Saunders, D. S. (2002). *Insect clocks.*, 3<sup>rd</sup> edition, Amsterdam: Elsevier.
- Schneider, C. P., Shukla, D., & Trout, B. L. (2011). Arginine and the Hofmeister series: the role of ion-ion interactions in protein aggregation suppression. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115(22), 7447-7458.
- Sformo, T., Walters, K., Jeannet, K., Wowk, B., Fahy, G. M., Barnes, B. M., & Duman, J. G. (2010). Deep supercooling, vitrification, and limited survival to -100 C in the Alaskan beetle *Cucujus clavipes puniceus* (Coleoptera: Cucujidae) larvae. *Journal of Experimental Biology*, 213(3), 502-509.
- Sharon, M. A., Kozarova, A., Clegg, J. S., Vacratsis, P. O., & Warner, A. H. (2009). Characterization of a group 1 late embryogenesis abundant protein in encysted embryos of the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Biochemistry and Cell Biology*, 87(2), 415-430.
- Shih M. D, Hoekstra F.A., Hsing Y.IC., (2008). Late embryogenesis abundant proteins. *Adv. Bot. Res.* 48:211-55
- Shimada, K. (1988). Cold acclimation, inoculative freezing and slow cooling: essential factors contributing to the freezing-tolerance in diapausing larvae of *Chymomyza costata* (Diptera; Drosophilidae). *Cryo-letters*, 9, 5-10.
- Shimada, K. (1990). Cold-induced freezing tolerance in diapausing and non-diapausing larvae of *Chymomyza costata* (Diptera: Drosophilidae) with accumulation of trehalose and proline. *Cryo-Letters*, 11, 243-250.
- Shimizu, T., Kanamori, Y., Furuki, T., Kikawada, T., Okuda, T., Takahashi, T., ... & Sakurai, M. (2010). Desiccation-induced structuralization and glass formation of group 3 late embryogenesis abundant protein model peptides. *Biochemistry*, 49(6), 1093-1104.
- Sinclair, B. J., & Chown, S. L. (2003). Rapid responses to high temperature and desiccation but not to low temperature in the freeze tolerant sub-Antarctic caterpillar *Pringleophaga marioni* (Lepidoptera, Tineidae). *Journal of Insect Physiology*, 49(1), 45-52.
- Sinclair, B. J., & Renault, D. (2010). Intracellular ice formation in insects: unresolved after 50 years? *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 155(1), 14-18.
- Sinclair, B. J., Ferguson, L. V., Salehipour-Shirazi, G., & MacMillan, H. A. (2013). Cross-tolerance and cross-talk in the cold: relating low temperatures to desiccation and immune stress in insects. *Integrative and comparative biology*, 53(4), 545-556.

- 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 molecular biology*, 16(4), 435-443.
- Sinclair, B. J., Vernon, P., Klok, C. J., & Chown, S. L. (2003). Insects at low temperatures: an ecological perspective. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(5), 257-262.
- Sinensky, M. (1974). Homeoviscous adaptation—a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(2), 522-525.
- Singer, M. A., & Lindquist, S. (1998). Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends in biotechnology*, 16(11), 460-468.
- Solomon, A., Salomon, R., Paperna, I., & Glazer, I. (2000). Desiccation stress of entomopathogenic nematodes induces the accumulation of a novel heat-stable protein. *Parasitology*, 121(4), 409-416.
- Somero, G. N. (1986). Protons, osmolytes, and fitness of internal milieu for protein function. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 251(2), R197-R213.
- Sømme, L. (1982). Supercooling and winter survival in terrestrial arthropods. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 73(4), 519-543.
- Stacy, R. A., & Aalen, R. B. (1998). Identification of sequence homology between the internal hydrophilic repeated motifs of Group 1 late-embryogenesis-abundant proteins in plants and hydrophilic repeats of the general stress protein GsiB of *Bacillus subtilis*. *Planta*, 206(3), 476-478.
- Stehlík, J., Závodská, R., Shimada, K., Šauman, I., & Košťál, V. (2008). Photoperiodic induction of diapause requires regulated transcription of timeless in the larval brain of *Chymomyza costata*. *Journal of Biological Rhythms*, 23(2), 129-139.
- Steponkus, P. L., Uemura, M., Joseph, R. A., Gilmour, S. J., & Thomashow, M. F. (1998). Mode of action of the COR15a gene on the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(24), 14570-14575.
- Štětina, T., Des Marteaux, L. E., & Košťál, V. (2020). Insect mitochondria as targets of freezing-induced injury. *Proceedings of the Royal Society B*, 287(1931), 20201273.
- Štětina, T., Košťál, V., & Korbelová, J. (2015). The role of inducible Hsp70, and other heat shock proteins, in adaptive complex of cold tolerance of the fruit fly (*Drosophila melanogaster*). *PLoS One*, 10(6), e0128976.
- Storey, J. M., & Storey, K. B. (1985). Freezing and cellular metabolism in the gall fly larva, *Eurosta solidaginis*. *Journal of Comparative Physiology B*, 155(3), 333-337.
- Storey, K. B., & Storey, J. M. (1988). Freeze tolerance in animals. *Physiological reviews*, 68(1), 27-84.
- Storey, K. B., & Storey, J. M. (1991). Biochemistry of cryoprotectants. In *Insects at low temperature* (pp. 64-93). Springer, Boston, MA.
- Storey, K. B., & Storey, J. M. (2013). Molecular biology of freezing tolerance. *Comprehensive Physiology*, 3(3), 1283-1308.
- Storey, K. B., Keefe, D., Kourtz, L., & Storey, J. M. (1991). Glucose-6-phosphate dehydrogenase in cold hardy insects: kinetic properties, freezing stabilization, and control of hexose monophosphate shunt activity. *Insect Biochemistry*, 21(2), 157-164.
- Strachan, L. A., Tarnowski-Garner, H. E., Marshall, K. E., & Sinclair, B. J. (2011). The evolution of cold tolerance in *Drosophila* larvae. *Physiological and Biochemical Zoology*, 84(1), 43-53.

- Strudwick, N., & Schröder, M. (2007). The unfolded protein response. In *Systems biology* (pp. 69-155). Springer, Dordrecht.
- Suarez, R. K., & Moyes, C. D. (2012). Metabolism in the age of 'omes'. *Journal of Experimental Biology*, 215(14), 2351-2357.
- Sunday, J. M., Bates, A. E., & Dulvy, N. K. (2011). Global analysis of thermal tolerance and latitude in ectotherms. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1713), 1823-1830.
- Sunday, J. M., Bates, A. E., & Dulvy, N. K. (2012). Thermal tolerance and the global redistribution of animals. *Nature Climate Change*, 2(9), 686-690.
- Suutari, M., Rintamäki, A., & Laakso, S. (1997). Membrane phospholipids in temperature adaptation of *Candida utilis*: alterations in fatty acid chain length and unsaturation. *Journal of lipid research*, 38(4), 790-794.
- Tamiya, T., Okahashi, N., Sakuma, R., Aoyama, T., Akahane, T., & Matsumoto, J. J. (1985). Freeze denaturation of enzymes and its prevention with additives. *Cryobiology*, 22(5), 446-456.
- Tapia, H., & Koshland, D. E. (2014). Trehalose is a versatile and long-lived chaperone for desiccation tolerance. *Current Biology*, 24(23), 2758-2766.
- Tasaka, Y., Gombos, Z., Nishiyama, Y., Mohanty, P., Ohba, T., Ohki, K., & Murata, N. (1996). Targeted mutagenesis of acyl-lipid desaturases in *Synechocystis*: evidence for the important roles of polyunsaturated membrane lipids in growth, respiration, and photosynthesis. *The EMBO journal*, 15(23), 6416-6425.
- Teets, N. M., & Denlinger, D. L. (2013). Physiological mechanisms of seasonal and rapid cold-hardening in insects. *Physiological Entomology*, 38(2), 105-116.
- Thompson, S. N. (2003). Trehalose—the insect 'blood'sugar. *Advances in insect physiology*, 31(Supplement C), 205-285.
- Throckmorton, L. H. (1975). The phylogeny, ecology and geography of *Drosophila*. *Handbook of genetics*, 3(17), 422-469.
- Tian, Y., Liu, J., Yang, F., Lian, C., Zhang, H., Viles, J. H., & Li, Z. Therapeutic potential for amyloid surface inhibitor: Only Amyloid- $\beta$  oligomers formed by secondary nucleation disrupt lipid membrane integrity. *The FEBS Journal*.
- Timasheff, S. N. (1992a). Water as ligand: preferential binding and exclusion of denaturants in protein unfolding. *Biochemistry*, 31(41), 9857-9864.
- Timasheff, S. N. (1992b). A physicochemical basis for the selection of osmolytes by nature. In *Water and life* (pp. 70-84). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Timasheff, S. N. (1993). The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes?. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 22(1), 67-97.
- Timasheff, S. N. (1998). In disperse solution, "osmotic stress" is a restricted case of preferential interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(13), 7363-7367.
- Timasheff, S. N. (2002). Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(15), 9721-9726.
- Toda, M. J. (1985). Habitat structure of a drosophilid community at Inuvik, NWT, Canada (Diptera: Drosophilidae). *The Canadian Entomologist*, 117(1), 135-137.
- Tollarová, M. (2008). Seasonal activity-profiles of enzymes involved in cryoprotectant biosynthesis in *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Pyrrhocoridae). *European Journal of Entomology*, 105(1).

- Tolleter, D., Hinch, D. K., & Macherel, D. (2010). A mitochondrial late embryogenesis abundant protein stabilizes model membranes in the dry state. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1798(10), 1926-1933.
- Tomcala, A., Tollarová, M., Overgaard, J., Simek, P., & Kostal, V. (2006). Seasonal acquisition of chill tolerance and restructuring of membrane glycerophospholipids in an overwintering insect: triggering by low temperature, desiccation and diapause progression. *Journal of Experimental Biology*, 209(20), 4102-4114.
- Torson, A. S., Yocum, G. D., Rinehart, J. P., Kemp, W. P., & Bowsher, J. H. (2015). Transcriptional responses to fluctuating thermal regimes underpinning differences in survival in the solitary bee *Megachile rotundata*. *The Journal of Experimental Biology*, 218(7), 1060-1068.
- Toxopeus, J., & Sinclair, B. J. (2018). Mechanisms underlying insect freeze tolerance. *Biological Reviews*, 93(4), 1891-1914.
- Toxopeus, J., Des Marteaux, L. E., & Sinclair, B. J. (2019). How crickets become freeze tolerant: the transcriptomic underpinnings of acclimation in *Gryllus veletis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 29, 55-66.
- Toxopeus, J., Warner, A. H., & MacRae, T. H. (2014). Group 1 LEA proteins contribute to the desiccation and freeze tolerance of *Artemia franciscana* embryos during diapause. *Cell Stress and Chaperones*, 19(6), 939-948.
- Troitzsch, R. Z., Vass, H., Hossack, W. J., Martyna, G. J., & Crain, J. (2008). Molecular mechanisms of cryoprotection in aqueous proline: light scattering and molecular dynamics simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*, 112(14), 4290-4297.
- Tunnacliffe, A., & Wise, M. J. (2007). The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften*, 94(10), 791-812.
- Tunnacliffe, A., Lapinski, J., & McGee, B. (2005). A putative LEA protein, but no trehalose, is present in anhydrobiotic bdelloid rotifers. *Hydrobiologia*, 546(1), 315-321.
- Uemura, M., Gilmour, S. J., Thomashow, M. F., & Steponkus, P. L. (1996). Effects of COR6.6 and COR15am polypeptides encoded by COR (cold-regulated) genes of *Arabidopsis thaliana* on the freeze-induced fusion and leakage of liposomes. *Plant Physiology*, 111(1), 313-327.
- Uversky, V. N., & Dunker, A. K. (2010). Understanding protein non-folding. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1804(6), 1231-1264.
- Viner, R. I., & Clegg, J. S. (2001). Influence of trehalose on the molecular chaperone activity of p26, a small heat shock/ $\alpha$ -crystallin protein. *Cell stress & chaperones*, 6(2), 126.
- Walker, G. P., & Denlinger, D. L. (1980). Juvenile hormone and moulting hormone titres in diapause- and non-diapause destined flesh flies. *Journal of Insect Physiology*, 26(10), 661-664.
- Wang, G., Li, S., Lin, H. N., & Huang, C. (1997). Influence of cis double bonds in the sn-2 acyl chain of phosphatidylethanolamine on the gel-to-liquid crystalline phase transition. *Biophysical journal*, 73(1), 283-292.
- Wang, J., Zhang, J., Zhu, K., Zhou, P., & Zhang, Z. (2020). Effects of recombinant AavLEA1 protein on human umbilical cord matrix mesenchymal stem cells survival during cryopreservation. *Biopreservation and Biobanking*, 18(4), 290-296.
- Wang, L., Weller, C.L. (2011) Thermophysical properties of frozen foods. In *Handbook of Frozen Food Processing and Packaging*, 2nd edition (ed. D.-W. Sun), pp. 101-125. Boca Raton: CRC Press
- Wang, W. (1999). Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *International journal of pharmaceuticals*, 185(2), 129-188.

- Welin, B. V., Olson, Å., Nylander, M., & Palva, E. T. (1994). Characterization and differential expression of *dhn/lea/rab*-like genes during cold acclimation and drought stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology*, *26*(1), 131-144.
- Wise, M. J. (2002). The POPPs: clustering and searching using peptide probability profiles. *Bioinformatics*, *18*(suppl\_1), S38-S45.
- Wise, M. J. (2003). LEAPing to conclusions: a computational reanalysis of late embryogenesis abundant proteins and their possible roles. *BMC bioinformatics*, *4*(1), 1-19.
- Wise, M. J., & Tunnacliffe, A. (2004). POPP the question: what do LEA proteins do? *Trends in plant science*, *9*(1), 13-17.
- Wolkers, W. F., McCready, S., Brandt, W. F., Lindsey, G. G., & Hoekstra, F. A. (2001). Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, *1544*(1-2), 196-206.
- Xie, G., & Timasheff, S. N. (1997). The thermodynamic mechanism of protein stabilization by trehalose. *Biophysical chemistry*, *64*(1-3), 25-43.
- Yancey, P. H. (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic, and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *Journal of experimental biology*, *208*(15), 2819-2830.
- Yancey, P. H., & Siebenaller, J. F. (2015). Co-evolution of proteins and solutions: protein adaptation versus cytoprotective micromolecules and their roles in marine organisms. *The Journal of experimental biology*, *218*(12), 1880-1896.
- Yocum, G. D., Rinehart, J. P., Horvath, D. P., Kemp, W. P., Bosch, J., Alroobi, R., & Salem, S. (2015). Key molecular processes of the diapause to post-diapause quiescence transition in the alfalfa leafcutting bee *Megachile rotundata* identified by comparative transcriptome analysis. *Physiological Entomology*, *40*(2), 103-112.
- Yoshida, T., & Kimura, M. T. (1995). The photoperiodic clock in *Chymomyza costata*. *Journal of Insect Physiology*, *41*(3), 217-222.
- Zachariassen, K. E. (1985). Physiology of cold tolerance in insects. *Physiological reviews*, *65*(4), 799-832.
- Zachariassen, K. E., & Kristiansen, E. (2000). Ice nucleation and antinucleation in nature. *Cryobiology*, *41*(4), 257-279.



## 8. Přílohy

### Příloha 1

## PROCEEDINGS B

royalsocietypublishing.org/journal/rspb

### Research



**Cite this article:** Des Marteaux LE, Hůla P, Košťál V. 2019 Transcriptional analysis of insect extreme freeze tolerance. *Proc. R. Soc. B* **286**: 20192019.  
<http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2019.2019>

Received: 30 August 2019

Accepted: 1 October 2019

#### Subject Category:

Development and physiology

#### Subject Areas:

bioinformatics, molecular biology, physiology

#### Keywords:

insect, cryopreservation, transcriptome, cryoprotectant, cold acclimation

#### Author for correspondence:

Lauren E. Des Marteaux

e-mail: [ldesmart@gmail.com](mailto:ldesmart@gmail.com)

Electronic supplementary material is available online at <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.c.4693079>.

THE ROYAL SOCIETY  
PUBLISHING

## Transcriptional analysis of insect extreme freeze tolerance

Lauren E. Des Marteaux<sup>1</sup>, Petr Hůla<sup>1,2</sup> and Vladimír Košťál<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Entomology, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, České Budějovice 370 05, Czech Republic

<sup>2</sup>Faculty of Science, University of South Bohemia, Branišovská 31, České Budějovice 370 05, Czech Republic

LED, 0000-0002-0461-2704

Few invertebrates can survive cryopreservation in liquid nitrogen, and the mechanisms by which some species do survive are underexplored, despite high application potential. Here, we turn to the drosophilid *Chymomyza costata* to strengthen our fundamental understanding of extreme freeze tolerance and gain insights about potential avenues for cryopreservation of biological materials. We first use RNAseq to generate transcriptomes of three *C. costata* larval phenotypic variants: those warm-acclimated in early or late diapause (weak capacity to survive cryopreservation), and those undergoing cold acclimation after diapause entry (extremely freeze tolerant, surviving cryopreservation). We identify mRNA transcripts representing genes and processes that accompany the physiological transition to extreme freeze tolerance and relate cryopreservation survival to the transcriptional profiles of select candidate genes using extended sampling of phenotypic variants. Enhanced capacity for protein folding, refolding and processing appears to be a central theme of extreme freeze tolerance and may allow cold-acclimated larvae to repair or eliminate proteins damaged by freezing (thus mitigating the toxicity of denatured proteins, endoplasmic reticulum stress and subsequent apoptosis). We also find a number of candidate genes (including both known and potentially novel, unannotated sequences) whose expression profiles tightly mirror the change in extreme freeze tolerance status among phenotypic variants.

### 1. Introduction

The mechanisms by which overwintering insects survive at sub-zero body temperatures have been investigated for more than a century (see, for instance, reviews in [1–7]). Specific molecular, biochemical and physiological adjustments underlying this survival are typically assigned to one of three cold hardiness ‘strategies’ based on the phase behaviour of body water during cold exposure: (i) *supercooling* (maintenance of body water in the liquid phase), (ii) *cryoprotective dehydration* (loss of a substantial proportion of the body water by evaporation) and (iii) *freeze tolerance* (conversion of body water to the solid phase—ice crystals). Freeze tolerance evolved multiple times in a diverse array of insects [7,8]. Although most freeze-tolerant insects perish at temperatures below a species-specific threshold (the lower lethal temperature; LLT) typically between  $-5^{\circ}\text{C}$  and  $-40^{\circ}\text{C}$  [4,9], some insects and other invertebrates seem to have no LLT and withstand freezing to the temperature of liquid nitrogen ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), even in a fully hydrated state; examples include the nematode *Anguillula silusiae* [10], rotifer *Philodina acuticornis* [11], poplar sawfly *Trichiocampus populi* [12], malt fly *Chymomyza costata* [13] and leech *Ozobranchus jantseanus* [14]. These extremely freeze-tolerant animals may hold the key to advancing techniques in cryopreservation of tissues, organs or even complex organisms [15]. More specifically for insects, such techniques would improve the management of stock populations for research and application [16–21].

In order to build up extreme (or high) freeze tolerance, malt fly larvae (and other adapted insects, respectively) typically enter diapause and then undergo

© 2019 The Author(s) Published by the Royal Society. All rights reserved.

cold acclimation [7,22,23]. Diapause is a seasonal phenotype associated with arrested development and deep metabolic suppression [24,25], while cold acclimation further increases resistance to environmental stress [24,26]. Both adaptive complexes—diapause and cold acclimation—are based on the massive alteration of -omic profiles from the transcriptome [27–30], through proteome [31,32], to metabolome [33,34]. One of the key mechanisms underlying extreme freeze tolerance in insects is the accumulation of high concentrations of low molecular mass cryoprotective compounds (CPs). For instance, diapausing cold-acclimated *T. populi* prepupae accumulate trehalose (up to 202 mmol kg<sup>-1</sup> of total body water) [12] while diapausing cold-acclimated malt fly larvae accumulate proline (up to 339 mmol kg<sup>-1</sup> total body water) [23,35,36]. The CPs act through various mechanisms including a colligative reduction in the relative amount of ice [37,38], stabilization of lipid bilayers [39], stabilization of proteins' native structures [40,41] and/or promoting vitrification [23,42]. It is well known in practical cryogenics that both natural and engineered CPs facilitate the storage of cells and tissues at ultra-low temperatures [42]. However, the application of CPs to non-adapted (e.g. tropical) and/or non-acclimated (e.g. non-diapause, warm-acclimated) insects is only partially successful in improving their freeze tolerance [23,35,43].

In insects with extreme freeze tolerance, we speculate that CPs work in synergy with macromolecular protective systems that are seasonally stimulated. Indeed, a number of proteins with different cryoprotective roles are specifically enhanced in abundance during diapause and cold acclimation, including ice-binding proteins, heat shock proteins (HSPs) and late embryogenesis abundant (LEA) proteins. IBP adsorption to ice planes slows or limits their growth and prevents ice recrystallization damage [44,45], while HSPs assist in protein folding, localization and degradation [46]. Small HSPs (sHSPs) and LEA proteins act as 'molecular shields' which prevent protein aggregation during desiccation and freezing [47–50]. These macromolecules can also cooperate with CPs to protect cellular and protein structure under thermal or desiccation stress. For example, the interaction of sHSP p26 with trehalose significantly improves both mammalian cell survival during drying [51] and protection/reaction of thermally inactivated citrate synthase in brine shrimp [52]. Cryophilic diatom-derived IBP reduces freezing damage to human blood cells only in the presence of glycerol [53]. LEA proteins act synergistically with trehalose to prevent protein aggregation during dehydration stress [54]. Still, the role of such macromolecules in insect extreme freeze tolerance remains unknown as they have yet to be assessed in the few species capable of surviving deep cryopreservation. Extremely freeze-tolerant insects may further possess unique (novel) proteins that behave similarly to CPs by preventing unwanted interactions between other macromolecules, complexes and organelles in frozen (i.e. tightly packed, dehydrated) cells.

Here, we aimed to identify candidate macromolecules and processes that potentially contribute to the survival of malt fly larvae in liquid nitrogen. Specifically, we employed a non-targeted transcriptomics approach (RNAseq) to broadly compare gene expression among three larval phenotypes differing in freeze tolerance: larvae in early and late diapause (under warm conditions) are moderately freeze tolerant, while larvae that are cold-acclimated after diapause

entry develop extreme freeze tolerance (including storability in liquid nitrogen). To validate RNAseq results and further resolve the candidate proteins whose transcriptional patterns most closely associate with extreme freeze tolerance, we performed qPCR for select sequences over an extended sampling plan (additional time points throughout diapause maintenance and cold acclimation). The transcriptomics approach is a rapid, sensitive and technically feasible means of comparing among multiple phenotypes and time points and will be complemented by forthcoming metabolomic and proteomic studies (in preparation). Cryoprotective proteins must be present in high abundance to act as molecular shields, and although mRNA transcript expression does not necessarily reflect protein abundance [55], this rough estimate of relative protein abundance allows us to focus on transcripts with large fold changes across larval variants.

## 2. Material and methods

### (a) Malt fly rearing and acclimation

We reared malt fly colonies ('Sapporo' strain, originating from Japan [56]) on artificial diet in MIR 154 incubators (Sanyo Electric, Osaka, Japan) as described previously [57]. For experiments, we generated three different malt fly larvae phenotypic variants (details in electronic supplementary material, figure S1) according to our earlier protocols [22,27,58]: (1) non-diapause 'LD' larvae—which pupate after approximately three weeks and emerge as adults after approximately one month; (2) diapausing, warm-acclimated 'SD' larvae—which do not pupate but maintain diapause until death; and (3) cold-acclimated 'SDA' larvae—which develop extreme freeze tolerance, gradually terminate their diapause within two months and remain in quiescence [23,35].

### (b) RNAseq: library preparation, sequencing, alignment and annotation

We used three biological replicates (each comprising 10 pooled larvae) for transcriptome sequencing of three malt fly variants: early diapause (SD6); late diapause (SD11) and cold acclimated (SDA11) (see electronic supplementary material, figure S1 for explanation). The pools of larvae were homogenized in 400 µl RNA Blue (Top-Bio, Vestec, Czech Republic) for 30 s on ice. Total RNA was extracted according to manufacturer's instructions for RNA blue, treated with DNase I (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Prague, Czech Republic) and diluted to a final concentration of 0.1 µg RNA per µl in PCR Ultra H<sub>2</sub>O. RNA quality checking, cDNA library preparation and 80 bp, single-end read sequencing on the Illumina NextSeq 500 (Illumina, San Diego, CA) were performed by the EMBL Genomics Core Facility (Heidelberg, Germany). Sequencing of the nine cDNA libraries across the three malt fly variants yielded a total of 357 million reads with an average GC content of 47.5%. We assessed the quality of sequenced libraries by FastQC software (v. 0.11.5) [59] and used Trimmomatic [60] via the Galaxy Web service [61] to remove adapter sequences and discard sequences shorter than 36 nucleotides or containing unknown bases. Approximately 304 million reads remained after quality control. Through the Galaxy Web service, we used Bowtie2 [62] to align reads to a previously assembled reference malt fly transcriptome derived from both LD and SD larvae (a full assembly of 113 447 contigs, which was further refined to 21 326 non-redundant contigs [63]). Just over 99% of our reads aligned to the full reference assembly. We then used Cufflinks [64] to assemble transcripts (contigs) and estimate read counts. These normalized libraries contained a total of 22 872 contigs with

non-zero read counts (representing 86.1% of the refined reference assembly; [63]). Libraries were further filtered to remove contigs with low abundance (those with fewer than five read counts per million in three of the six libraries per comparison) [65], yielding approximately 6800 contigs per library.

### (c) Differential expression analyses and annotation

We compared relative transcript abundance among malt fly variants using the edgeR Bioconductor package [65] for R statistical software (v. 3.2.2) [66,67]. Criteria for differential expression analyses were conservative; genes were considered to be differentially expressed (DE) if the *p*-value (adjusted for false discovery rate; FDR) was less than 0.05 and the absolute fold change between treatments was greater than or equal to 4 (log<sub>2</sub> fold change greater than or equal to 2). Biological coefficients of variation did not exceed 0.3 (i.e. gene expression among biological replicates varied by less than 30%). DE transcripts were annotated with Blast2GO software (v. 4.1.9, Oracle Corp.) [68]. Putative identities were assigned by BLASTx against the non-redundant (nr) protein database (NCBI, November 2017) (*E*-value threshold =  $1 \times 10^{-3}$ , accepting five hits for each transcript), mapped for Gene Ontology (GO) terms and annotated (*E*-value threshold =  $1 \times 10^{-6}$ ). Approximately 65% of the contigs had putative identities, 5% were predicted or uncharacterized proteins and 30% had no putative identity. We attempted to identify the uncharacterized or predicted proteins via a less-stringent BLASTx search against the nr database (*E*-value threshold = 1, accepting 100 hits for each transcript) using Geneious software (v. 10.1.3, Biomatters Ltd.). In this way, we gained putative identities for an additional 50 transcripts. Finally, we assigned all annotated DE genes to one of 10 custom categories: 'Development', 'Cuticle', 'Metabolism', 'Detoxification', 'Membranes', 'Cytoskeleton', 'Transcription', 'Protein processing', 'Other' and 'Uncharacterized' (electronic supplementary material, spreadsheet S1) based on functional information from the literature and online databases (UniProt and FlyBase).

We characterized the coordinated differential expression of pathways (functionally related gene sets) according to KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; [69]). KEGG identities for contigs were retrieved from the KEGG Automatic Annotation Server [70] based on non-species-specific reference pathways. Approximately 21% of the contigs with non-zero read counts were assigned to KEGG pathways. Differential pathway expression among malt fly variants was analysed based on read counts for transcripts with KEGG identities using the Generally Applicable Gene-set Enrichment (GAGE) and Pathview Bioconductor packages [71,72] in R. We accepted pathways as DE if the FDR-adjusted *p*-value was less than 0.05. Because GAGE assesses coordinated expression change, these pathway analyses identified more DE genes relative to our more strict criteria (greater than or equal to fourfold change) for individual genes assessed via edgeR (above).

### (d) Direct validation

Direct validation of edgeR analysis was performed (a) from the same aliquots of total RNA samples used to generate transcriptomes (technical validation) and (b) in an independent set of new biological replicates (a new generation of flies) conditioned exactly as in electronic supplementary material, figure S1 (biological validation). We used quantitative real-time PCR (qPCR) on a CFX96 PCR cycler (BioRad, Philadelphia, PA, USA) to amplify 10 select DE sequences against four reference genes (sequences coding for Ribosomal proteins RpL32 (Rp49), RpL19, RpS11 and RpS27A [27]) (see electronic supplementary material, figure S2 for methods details). All PCR primer sequences can be found in electronic supplementary material, spreadsheet S1.

### (e) Extended validation and extreme freeze tolerance assays

An extended validation of the RNAseq results was performed with the aim to retrieve the best candidate sequences with transcriptional patterns most closely associated with extreme freeze tolerance. For this purpose, we prepared a new, extended set of total RNA samples from larvae representing different phenotypes (electronic supplementary material, spreadsheet S1) in four biological replicates, each comprised of 10 pooled larvae. Total RNA samples were processed as described in RNAseq (above). Next, we performed qPCR analysis (as in *Direct validation*, above) for an arbitrary selection of 15 candidate genes based on results of RNAseq DE analyses (all target and PCR primer sequences can be found in electronic supplementary material, spreadsheet S1). (a) We took six genes coding for HSPs (Hsp22, Lethal(2)efl, Hsp27, Hsp40, Hsp70 and Hsp83) in order to have representatives of the most clearly upregulated functional category 8 (Protein processing). We then took DE sequences scoring relatively high in log fold change (logFC), log counts per million (logCPM) and sequence length among those upregulated in cold-acclimated larvae (SDA11) relative to those in diapause maintenance (SD6 and SD11). This way we added (b) four sequences, coding for Yellow d (or Major royal jelly 1, Seq3773), Glutamic acid-rich protein (GARP, Seq93436), Larval serum protein 2 (Lsp2, Seq55855) and Companion of reaper (Corp, Seq5725) (functional category 9 'Other'), (c) four uncharacterized protein sequences: Seq102667, Seq80983, Seq3519 and Seq4228 and finally (d) one non-annotated (N/A) sequence: Seq93437.

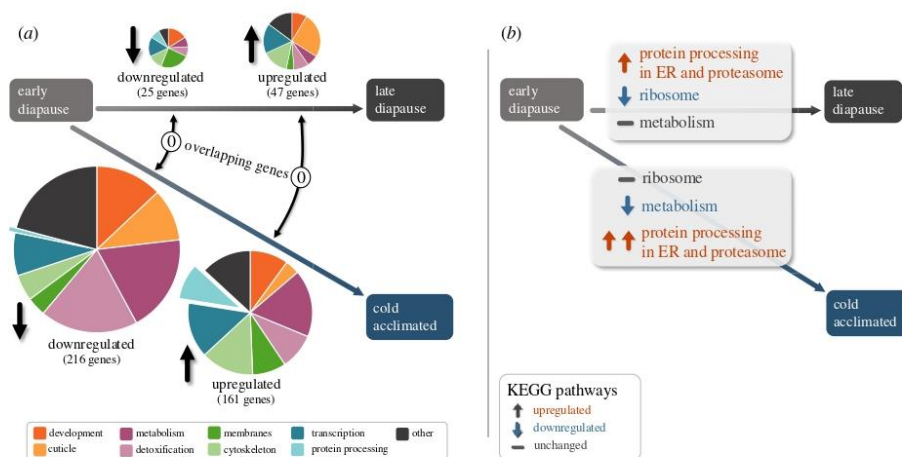
In parallel, we characterized the association between the transcriptomic profiles of the 15 candidate genes (above) and larval extreme freeze tolerance (capacity to survive after exposure to liquid nitrogen) for select LD, SD and SDA variants (electronic supplementary material, figure S2) using the optimum cryopreservation protocol described earlier [23]. Briefly, groups of 20 larvae were slowly cooled to  $-30^{\circ}\text{C}$ , plunged into liquid nitrogen for 60 min, then returned to  $-30^{\circ}\text{C}$  before rewarming to  $5^{\circ}\text{C}$ . Thawed larvae were transferred to fresh larval diet and maintained thereafter at  $18^{\circ}\text{C}$  and a long-day photoperiod. Dead larvae were removed 12 h later while all living larvae were maintained for a subsequent six weeks and the emergence of adult flies was scored as the ultimate criterion of survival. For each variant, extreme freeze tolerance was measured in 100–300 larvae and expression of each candidate gene was measured in four larvae.

## 3. Results and discussion

To our knowledge, this is the first transcriptomic characterization of an insect capable of surviving prolonged cryopreservation in liquid nitrogen. We used the comparative transcriptomic approach as an hypothesis-generating first step in seeking new candidate cryoprotectants and to further understand the physiological mechanisms of extreme freeze tolerance; however, we acknowledge that other forms of gene and protein regulation which may be important (e.g. miRNAs or post-translational modifications) [73] are not captured by our methods and therefore warrant investigation in future.

### (a) Differentially regulated genes and pathways

We observed fewer DE genes between early and late diapause phenotypes (190 transcripts) than between early diapause and cold-acclimated phenotypes (776 transcripts). A full list of DE genes is available in electronic supplementary material, spreadsheet S1. Of those genes with putative identities, 25 and



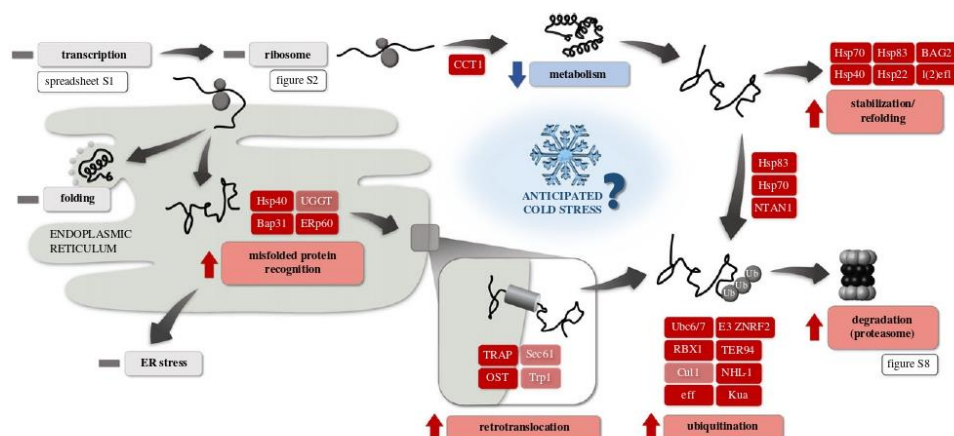
**Figure 1.** Summary of DE genes with putative identities (a) and select DE KEGG pathways (b) for third instar malt fly larvae in the states of late diapause or cold acclimation relative to early diapause. Genes were sorted according to custom functional categories and the numbers of DE genes in different categories are reflected in pie diagram size (the total number of DE genes given below). A full list of DE genes (including the description of functional categories) and KEGG pathways are given in electronic supplementary material, spreadsheet S1 and figure S3, respectively. (Online version in colour.)

47 were down- and upregulated in late diapause (respectively), while 216 and 161 were down- and upregulated with cold acclimation, respectively). Only a single DE gene (Seq109825; downregulated but with no putative identity) overlapped between late diapause and cold acclimation (relative to early diapause), suggesting that cold acclimation and development of extreme freeze tolerance may involve a unique set of physiological processes distinct from those linked to diapause progression.

In a recent review of insect freeze tolerance, Toxopeus & Sinclair [7] hypothesized that five broad mechanisms are involved: (1) control of ice formation; (2) reduction of ice content; (3) stabilization of macromolecules; (4) management of biochemical processes/reduction of harmful metabolite damage and (5) post-thaw repair and recovery. We did not expect to see a reflection of mechanism 1 in this study, as no gene annotations in the *C. costata* transcriptome [63] had identifiers such as ice binding, nucleation or thermal hysteresis. Moreover, our knowledge suggests that *C. costata* has limited capacity to control ice formation: neither supercooling capacity nor vulnerability to ice inoculation changed much with acclimation [23,35], and there is no sign of thermal hysteresis activity in larval haemolymph (V. Košťál & J. Rozsypal 2017, unpublished observations). Ice content (related to mechanism 2) differs only slightly among *C. costata* larval variants with decreasing temperatures (described previously by [23]). Mechanism 3 probably involves cryoprotectant accumulation as a non-colligative means of stabilizing macromolecular structures, and despite that cryoprotectant accumulation is a hallmark of *C. costata* freeze tolerance [23,35], we found little direct reflection of it in the transcriptome. Similar lack of evidence for direct transcriptional control of cryoprotectant synthesis (myo-inositol, proline and trehalose) was reported for the freeze-tolerant cricket, *Gryllus veletis* [43]. The reasons for such results may relate to the importance of post-transcriptional control mechanisms [43], general problems with interpretation of metabolism using -omics approaches

[74] and/or technical limitations such as insufficient resolution at time and tissue levels. Mechanism 3 also includes the upregulation of molecular chaperones (a common phenomenon of insect thermal tolerance, e.g. [75,76]), which was clearly supported in the *C. costata* transcriptome (discussed further in the next section). Mechanism 4 was reflected in the form of global downregulation of processes in *C. costata* larvae linked to active metabolism, including oxidative phosphorylation (figure 1b; a full list of the pathways provided in electronic supplementary material, figure S3). Still, ribosomal transcription was generally maintained during cold acclimation (figure 1; electronic supplementary material, figure S3–S5). The aspect of mechanism 4 relating to the reduction of damage from harmful metabolites showed rather a trend of downregulation (electronic supplementary material, spreadsheet S1) and no systematic reflection in KEGG pathways. Mechanism 5 includes some elements overlapping with mechanism 3 (e.g. protein processing machinery), which appears to be a central theme of the transcriptomic transformation in extremely freeze-tolerant *C. costata* larvae.

Expression of genes related to the category ‘Protein processing’ was the most contrasting between larval variants; compared to early diapause, two genes were downregulated in late diapause, while 15 genes were upregulated with cold acclimation (figure 1b; electronic supplementary material, spreadsheet S1). Some pathways appeared to be statistically rather than biologically upregulated with progression from early to late diapause. For example, upregulation of KEGG pathway ko04141 (Protein processing in the endoplasmic reticulum) in late relative to early diapause was driven primarily by only a few genes; *secretory 61 (Sec61)*, *translocon-associated protein (TRAP)* and *Hsp70* (electronic supplementary material, figure S6). Similarly, the upregulation of pathway ko03050 (Proteasome) during late diapause was extremely weak (based on two genes, each in only one of the three biological replicates; see electronic supplementary material, figure S7). By contrast, the upregulation of both these pathways with



**Figure 2.** Upregulation of gene transcripts involved in protein processing machinery associated with the acquisition of extreme freeze tolerance in malt fly larvae. Genes/pathways in red are upregulated (with weaker red indicating relatively weaker upregulation), blue are downregulated and grey are unchanged for cold-acclimated larvae relative to those in early diapause. Differential expression was based on both KEGG pathways (electronic supplementary material, figures S3 and S8) and individual gene expression analyses (electronic supplementary material, spreadsheet S1) (see text for more details). See electronic supplementary material, figure S10 for a description of the upregulated genes and processes.

cold acclimation was supported by a large number of genes (electronic supplementary material, figures S8 and S9, spreadsheet S1). The relevance of enhanced protein processing capabilities for extreme freeze tolerance is discussed in detail below.

### (b) Roles of protein processing in extreme cold tolerance

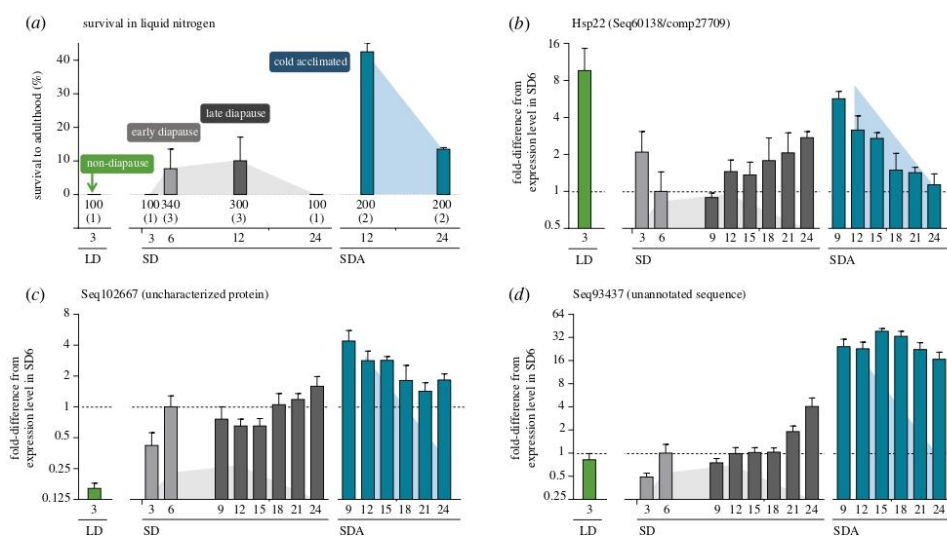
As both ice formation and low temperatures threaten the stability and function of proteins [77], extreme freeze tolerance should largely rely on enhanced protein protection (stabilization and chaperoning), repair (refolding) and/or degradation of denatured or misfolded proteins. Indeed, a growing body of literature highlights the importance of protein management for insect freeze tolerance [7]. Based on transcriptomic analysis, however, we cannot conclusively distinguish between upregulated responses representing (i) the direct response to proteins that failed to fold properly (or were partially denatured) during cold acclimation, and (ii) the removal of excess proteins that are no longer needed when the rates of all biological processes were drastically reduced by low temperature. We hypothesize that at least part of the upregulation represents (iii) an ‘anticipatory’ response (i.e. adaptive preparation for cold and freeze-dehydration stresses most likely to be endured during the overwintering period, which is supported by previous studies in flesh flies [78,79]).

Cold and freeze-dehydration stresses may impact the process of nascent proteins’ folding or mature proteins’ higher-order structures, causing their misfolding or unfolding, respectively. In both cases, the aberrant proteins elicit a complex network of responses including recognition, targeting, transport, refolding or elimination by degradation. A visual synthesis (based on results of DE analysis and KEGG analysis) of this enhanced machinery accompanying cold acclimation (i.e. acquisition of extreme freeze tolerance) is provided in figure 2 (see also electronic supplementary

material, figure S8 for the relevant KEGG pathway). We comment only briefly on the major elements of this machinery below and provide more specific descriptions of the roles of the individual genes in electronic supplementary material, figure S10).

In the endoplasmic reticulum (ER), misfolded proteins are eliminated by ER-associated degradation (ERAD). In this process (as summarized by [80]), misfolded proteins are exported (retrotranslocated) to the cytosol and ubiquitinated, which targets them for degradation by the 26S proteasome. Accumulation of misfolded proteins above the ER folding capacity (ER stress) initiates the unfolded protein response (UPR), which increases chaperone production and either allows recovery from ER stress or may result in apoptotic cell death. A single gene (coding for ATF4) was downregulated among three pathways that sense ER stress (i.e. those initiated by PERK, ATF6 and IRE1; electronic supplementary material, figure S8). This lack of differential expression related to actual ER stress indirectly supports the hypothesis that anticipatory enhancement of chaperones and other effectors of UPR occurs to deal with misfolded protein load that likely comes after future cold shock. Four genes upregulated in extremely freeze-tolerant larvae encoded proteins involved in misfolded protein recognition and targeting for ERAD: Hsp40, ERp60, Bap31 and UGGT. Another four genes encoded proteins involved in retrotranslocation of ERAD-targeted proteins to the cytosol: TRAP, Sec61, OST and Trp1 (figure 2). Cold acclimation also resulted in increased expression of multiple genes involved in protein ubiquitination (electronic supplementary material, figure S8), as well as genes encoding proteasome subunits (electronic supplementary material, figure S9).

In extremely freeze-tolerant larvae, six genes encoding chaperones involved in mature protein stabilization and refolding were upregulated: Hsp83, Hsp70, Hsp40, BAG2 and two sHSPs (Hsp22 and Lethal(2)efl) (figure 2). Hsp70



**Figure 3.** Freeze tolerance (a) and expression patterns of select sequences (b–d) in third instar malt fly larvae. In freeze tolerance assays (a), larvae were plunged into liquid nitrogen for 1 h using the optimum protocol described earlier [23]. After thawing, larvae were moved to long days at 18°C for six weeks and the emergence of adult flies was scored as the ultimate criterion of survival. Bars show means  $\pm$  s.d. and the numbers below each bar show the total number of larvae subjected to the assay (with the number of different fly generations assayed given in parentheses). Examples of transcriptional profiles are shown for three selected sequences (b–d). Each bar (representing a particular phenotypic variant, figure S1) is the mean  $\pm$  s.d. ( $n = 4$ ) relative expression of the target sequence compared to four reference genes (via RTqPCR). The relative expression in phenotypic variant SD6 (early diapause) is arbitrarily set to 1 and the expressions in all other variants are normalized to it. Shaded areas behind the bars indicate survival in liquid nitrogen for SD larvae (grey shading) and SDA larvae (blue shading), as derived from (a) (note that survival was zero for non-diapause LD larvae and also SD3 larvae).

(with co-chaperones BAG2 and Hsp40) and Hsp83 may additionally cooperate with co-chaperone CHIP to direct substrate proteins for degradation [80–86]. Similarly, the gene coding for Chaperonin-containing T-complex 1 (CCT1), which facilitates the folding of cytoskeletal (and other) proteins [87], was also upregulated. The importance of cytoskeletal protection and repair for maintaining cell structure, tissue integrity and transport function at low temperatures is supported by a growing number of studies in insects, including the malt fly [88–92]. Lethal(2)efl and mitochondrial Hsp22 stabilize and facilitate denatured protein refolding, preventing protein aggregation [93,94]. Through this enhanced protein processing, cold-acclimated malt fly larvae likely have an improved ability to remove damaged proteins before they reach toxic levels in the cytosol and/or before they accumulate to levels that induce ER stress, thereby avoiding induction of apoptotic pathways and subsequent cell death during and after cold exposure [80]. Taken together, this machinery is likely protective against protein crowding and denaturation at extremely low temperatures and/or upon cellular freeze dehydration.

### (c) Candidate cryoprotective genes

Cryopreservation survival analyses (figure 3a) confirmed that non-diapause larvae (LD3) and relatively young larvae destined to diapause (SD3) have no ability to survive in liquid nitrogen. A moderate capacity for such survival occurred in diapause maintenance phenotypes (SD6, SD12) but was lost with long-term maintenance (SD24). Truly extreme freeze tolerance (the highest capacity for survival in liquid nitrogen)

was found in cold-acclimated larvae at 12 weeks (SDA12), which perfectly confirmed our earlier results [23,35], but this was again partially lost with increasing time of storage at low temperature (SDA24). Examples of transcriptional profiles for three selected sequences are depicted in figure 3b–d, while all profiles are shown in electronic supplementary material, figures S11–S13. The transcriptional profiles of *lethal(2)efl* (electronic supplementary material, figure S11B) and *hsp70* (electronic supplementary material, figure S11E) matched relatively well with extreme freeze tolerance. Among the heat shock genes, the mitochondrial *hsp22* (figure 3b) stood out as a particularly interesting candidate considering its 7.5-fold increase in expression (SD6). Although expression of *hsp22* in non-diapause larvae (LD3) was also very high, the gene need not be necessarily removed from the list of candidate cryoprotective macromolecules. Hsp22 localizes to mitochondria [92] and may play very different roles in the two distinct physiological contexts: LD (direct development, rapid growth, high activity) versus SDA (diapause, deep metabolic suppression, no activity). The rapid metabolism of LD larvae must be supported by high activity of their mitochondria, and (in *D. melanogaster*) *hsp22* expression is upregulated with ageing and oxidative stress [95] as well as in response to rising ecdysone titres just prior to pupation [96,97]. These stimuli for *hsp22* upregulation are absent in the *C. costata* SDA phenotype. We also know that *C. costata* mitochondria are particularly susceptible to cryoinjury in LD larvae but are robust to freezing challenges in SDA larvae (T. Štětina & V. Košťál 2018, unpublished results). Potentially, Hsp22 could act (synergistically with other cryoprotectants and DE

chaperones) in SDA larvae to preserve mitochondrial structure during freeze-dehydration insult.

Transcriptional patterns of four other annotated but functionally poorly characterized genes are shown in electronic supplementary material, figure S12. *Lsp2* was characterized by extremely high expression in non-diapause LD3 larvae (more than 1000-fold higher than in early diapause), corresponding well to the proposed function of larval serum proteins as amino acid stores that rapidly build up in the haemolymph of larvae just prior to pupation [98]. Interestingly, *Lsp2* transcripts also gradually accumulated and reached considerably high levels (up to 100-fold) in cold-acclimated larvae relative to those in early diapause (electronic supplementary material, figure S12A). As ice forms in the extracellular space of malt fly larvae [35], it is possible that haemolymph-abundant *Lsp2* protein may somehow interfere with ice crystal growth. The expression of *Corp* (which is induced by DNA damage in *D. melanogaster* [99]) increased more than 10-fold in malt fly larvae upon cold acclimation (electronic supplementary material, figure S12B). *Corp* protein inhibits the pro-apoptotic activity of p53 and may thus mitigate apoptotic cell death for cold-acclimated larvae following a freezing challenge [99]. The transcripts of *yellow d* (electronic supplementary material, figure S12C) and *GARP* (electronic supplementary material, figure S12D) showed strong and persistent upregulation response to cold acclimation. The *yellow* family contains functionally poorly characterized genes that are most likely involved in melanin formation [100]. As development at lower temperatures increases melanin deposition in drosophilids (e.g. [101]), this might partially explain our results. *GARP* is a structural homologue of the functionally uncharacterized *D. melanogaster* gene CG43106 (putative *GARP* A0A0B4K825), but the relevance of this protein for extreme freeze tolerance is currently unclear.

Over half of the DE genes significantly up- or downregulated with cold acclimation coded for uncharacterized proteins or had no putative identities at all. Transcriptional profiles of five selected unidentified candidates are shown in electronic supplementary material, figure S13. Ideally, this set of unidentified genes contains novel and potentially important cryoprotectants. For instance, the uncharacterized Seq102667 (figure 3c) showed almost a perfect match to the profile of extreme freeze tolerance, while the unannotated Seq93437 (figure 3d) showed extremely strong and persistent response to cold acclimation. For select unannotated

candidates, we are now conducting more comprehensive searches for their putative identities, raising antibodies for localization and quantification of gene products, and performing functional validation assays (e.g. for enzyme activity *in vitro* and survival of transfected cells post-freezing, results in a forthcoming study).

#### 4. Conclusion

The transition from moderate to extreme freeze tolerance in malt fly larvae is accompanied by an enhanced protein processing capacity, probably in anticipation of oncoming cellular freeze-dehydration stress. With this 'prophylactic' response, cold-acclimated larvae may become better able to both protect and stabilize proteins, and repair or eliminate those which become damaged, thereby avoiding excessive misfolded protein load, ER stress and associated apoptosis. In addition to classical chaperones, we identified a number of functionally uncharacterized sequences in which the transcriptional profile perfectly matches the profile of larval extreme freeze tolerance (i.e. strong upregulation in response to cold acclimation). Identification of the protein products of these sequences, and their functional analysis, may be crucial for achieving not only a fundamental understanding of freeze tolerance plasticity in insects but also for obtaining new means of freeze tolerance manipulation for cryopreservation of cells, tissues and whole organisms.

**Data accessibility.** The sequencing datasets supporting the results of this article are available via the NCBI Sequence Read Archive (accession number: PRJNA499074).

**Authors' contributions.** V.K. conceptualized the study, P.H. prepared larvae and total RNA samples and performed qPCR validations and survival analysis, L.E.D.M. processed the transcriptomic data, performed the statistical analyses, prepared the figures and wrote the original manuscript draft, V.K. edited the final manuscript.

**Competing interests.** We declare we have no competing interests.

**Funding.** This research was supported by a Czech Science Foundation (grants 16-06374S and 19-13381S to V.K.). The funding body had no role in the study design, collection, analysis or interpretation of the data, nor the writing of the report or decision to submit the report for publication.

**Acknowledgements.** We would like to thank Jaroslava Korblová for preparing larvae and total RNA samples for RNAseq, Rodolphe Poupardin for providing the *de novo* assembled malt fly transcriptome and guidance for bioinformatics, and Jan Provazník for guidance with sequence library assessment and alignment.

#### References

- Bachmetjew P. 1901 *Experimentelle entomologische studien vom physikalisch-chemischen standpunkt aus*. Leipzig, Germany: Verlag von Wilhelm Engelmann.
- Payne NM. 1927 Measures of insect cold hardiness. *Biol. Bull.* **52**, 449–457. (doi:10.2307/1536906)
- Salt R. 1961 Principles of insect cold-hardiness. *Annu. Rev. Entomol.* **6**, 55–74. (doi:10.1146/annurev.en.06.010161.000415)
- Asahina E. 1970 Frost resistance in insects. *Adv. Insect Physiol.* **6**, 1–49.
- Lee RE. 1991 Principles of insect low temperature tolerance. In *Insects at low temperature* (eds RE Lee, DL Denlinger), pp. 17–46. Berlin, Germany: Springer.
- Teets NM, Denlinger DL. 2013 Physiological mechanisms of seasonal and rapid cold-hardening in insects. *Physiol. Entomol.* **38**, 105–116. (doi:10.1111/phen.12019)
- Toxopeus J, Sinclair BJ. 2018 Mechanisms underlying insect freeze tolerance. *Biol. Rev.* **93**, 1891–1914. (doi:10.1111/brv.12425)
- Chown S, Sinclair B. 2010 The macrophysiology of insect cold hardiness. In *Low temperature biology of insects* (eds DL Denlinger, RE Lee Jr), pp. 191–222. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Sinclair BJ. 1999 Insect cold tolerance: how many kinds of frozen? *Eur. J. Entomol.* **96**, 157–164.
- De Coninck L. 1951 On the resistance of the free-living nematode *Anguillula silusiae* to low temperatures. *Biodynamica* **7**, 77–84.
- Koehler JK. 1967 Studies on the survival of the rotifer *Philodina* after freezing and thawing. *Cryobiology* **3**, 392–399. (doi:10.1016/S0011-2240(67)80134-2)

12. Tanno K. 1971 Frost injury and resistance in the poplar sawfly, *Trichocampus populii* Okamoto. *Contrib. Inst. Low Temp. Sci.* **16**, 1–41. (doi:10.1016/s0011-2240(69)80014-3)
13. Moon I, Fujikawa S, Shimada K. 1996 Cryopreservation of *Chymomyza* larvae (Diptera: Drosophilidae) at  $-196^{\circ}\text{C}$  with extracellular freezing. *Cryo-Lett.* **17**, 105–110.
14. Suzuki D, Miyamoto T, Kikawada T, Watanabe M, Suzuki T. 2014 A leech capable of surviving exposure to extremely low temperatures. *PLoS ONE* **9**, e86807. (doi:10.1371/journal.pone.0086807)
15. Fahy GM, Wolk B. 2015 Principles of cryopreservation by vitrification. In *Cryopreservation and freeze-drying protocols*, 3rd edn (eds WF Walkers, H Oldenhof), pp. 21–82. Berlin, Germany: Springer.
16. Leopold R. 2007 Colony maintenance and mass-rearing: using cold storage technology for extending the shelf-life of insects. In *Area-Wide control of insect pests* (eds MJB Vreysen, AS Robinson, J Hendrichs), pp. 149–162. Berlin, Germany: Springer.
17. Mazur P, Schneider U, Mahowald AP. 1992 Characteristics and kinetics of subzero chilling injury in *Drosophila* embryos. *Cryobiology* **29**, 39–68. (doi:10.1016/0011-2240(92)90005-M)
18. Colinet H, Boivin G. 2011 Insect parasitoids cold storage: a comprehensive review of factors of variability and consequences. *Biol. Control* **58**, 83–95. (doi:10.1016/j.biocontrol.2011.04.014)
19. Wasyluk JM, Tice AR, Baust JG. 1988 Partial glass formation: a novel mechanism of insect cryoprotection. *Cryobiology* **25**, 451–458. (doi:10.1016/0011-2240(88)90053-3)
20. Steponkus P *et al.* 1990 Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos. *Nature* **345**, 170. (doi:10.1038/345170a0)
21. Leopold RA, Rinehart JP. 2010 A template for insect cryopreservation. In *Low temperature biology of insects* (eds DL Denlinger, RE Lee Jr), pp. 325–341. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
22. Košťál V, Mollaei M, Schöttner K. 2016 Diapause induction as an interplay between seasonal token stimuli, and modifying and directly limiting factors: hibernation in *Chymomyza costata*. *Physiol. Entomol.* **41**, 344–357. (doi:10.1111/phen.12159)
23. Rozsypal J, Moos M, Šimek P, Košťál V. 2018 Thermal analysis of ice and glass transitions in insects that do and do not survive freezing. *J. Exp. Biol.* **221**, 170464. (doi:10.1242/jeb.170464)
24. Denlinger DL. 1991 Relationship between cold hardiness and diapause. In *Insects at low temperature* (eds RE Lee, DL Denlinger), pp. 174–198. Berlin, Germany: Springer.
25. Hahn DA, Denlinger DL. 2011 Energetics of insect diapause. *Annu. Rev. Entomol.* **56**, 103–121. (doi:10.1146/annurev-ento-112408-085436)
26. Pullin AS. 1996 Physiological relationships between insect diapause and cold tolerance: coevolution or coincidence. *Eur. J. Entomol.* **93**, 121–130.
27. Košťál V, Štětina T, Poupardin R, Korbelová J, Bruce AW. 2017 Conceptual framework of the eco-physiological phases of insect diapause development justified by transcriptomic profiling. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **114**, 8532–8537. (doi:10.1073/pnas.1707281114)
28. Tang B, Liu X-J, Shi Z-K, Shen Q-D, Xu Y-X, Wang S, Zhang F, Wang S-G. 2017 Transcriptome analysis and identification of induced genes in the response of *Harmonia axyridis* to cold hardiness. *Comp. Biochem. Physiol. D* **22**, 78–89. (doi:10.1016/j.cbd.2017.01.004)
29. Des Marteaux LE, McKinnon AH, Udaka H, Toxopeus J, Sinclair B. 2017 Effects of cold-acclimation on gene expression in Fall field cricket (*Gryllus pennsylvanicus*) ionoregulatory tissues. *BMC Genomics* **18**, 357. (doi:10.1186/s12864-017-3711-9)
30. Ragland GJ, Keep E. 2017 Comparative transcriptomics support evolutionary convergence of diapause responses across Insecta. *Physiol. Entomol.* **42**, 246–256. (doi:10.1111/phen.12193)
31. Colinet H, Renault D, Charoy-Guével B, Com E. 2012 Metabolic and proteomic profiling of diapause in the aphid parasitoid *Praon volucre*. *PLoS ONE* **7**, e32606. (doi:10.1371/journal.pone.0032606)
32. Kristensen TN, Kjeldal H, Schou MF, Nielsen JL. 2016 Proteomic data reveal a physiological basis for costs and benefits associated with thermal acclimation. *J. Exp. Biol.* **219**, 969–976. (doi:10.1242/jeb.132696)
33. MacMillan HA, Knee JM, Dennis AB, Udaka H, Marshall KE, Merritt TJ, Sinclair BJ. 2016 Cold acclimation wholly reorganizes the *Drosophila melanogaster* transcriptome and metabolome. *Sci. Rep.* **6**, 28999. (doi:10.1038/srep28999)
34. Michaud MR, Denlinger DL. 2007 Shifts in the carbohydrate, polyol, and amino acid pools during rapid cold-hardening and diapause-associated cold-hardening in flesh flies (*Sarcophaga crassipalpis*): a metabolomic comparison. *J. Comp. Physiol. B* **177**, 753–763. (doi:10.1007/s00360-007-0172-5)
35. Košťál V, Zahradnickova H, Šimek P. 2011 Hyperprolinemic larvae of the drosophilid fly, *Chymomyza costata*, survive cryopreservation in liquid nitrogen. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**, 13 041–13 046. (doi:10.1073/pnas.1107060108)
36. Shimada K, Riihimaa A. 1988 Cold acclimation, inoculative freezing and slow cooling: essential factors contributing to the freezing-tolerance in diapausing larvae of *Chymomyza costata* (Diptera: Drosophilidae). *Cryo. Lett.* **9**, 5–10.
37. Zachariassen KE. 1985 Physiology of cold tolerance in insects. *Physiol. Rev.* **65**, 799–832. (doi:10.1152/physrev.1985.65.4.799)
38. Muldrew K, Acker JP, Elliott JA, McGann LE. 2004 The water to ice transition: implications for living cells. In *Life in the frozen state* (eds BJ Fuller, N Lane, EE Benson), pp. 93–134. Boca Raton, FL: CRC Press.
39. Crowe JH, Clegg JS, Crowe LM. 1998 Anhydrobiosis: the water replacement hypothesis. In *The properties of water in foods ISOPOW 6* (ed. DS Reid), pp. 440–455. Berlin, Germany: Springer.
40. Arakawa T, Timasheff SN. 1985 Theory of protein solubility. *Methods Enzymol.* **114**, 49–77. (doi:10.1016/0076-6879(85)14005-X)
41. Rudolph AS, Crowe JH. 1986 A calorimetric and infrared spectroscopic study of the stabilizing solute proline. *Biophys. J.* **50**, 423–430. (doi:10.1016/S0006-3495(86)83478-6)
42. Elliott GD, Wang S, Fuller BJ. 2017 Cryoprotectants: a review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryobiology* **76**, 74–91. (doi:10.1016/j.cryobiol.2017.04.004)
43. Toxopeus J, Košťál V, Sinclair Brent J. 2019 Evidence for non-colligative function of small cryoprotectants in a freeze-tolerant insect. *Proc. R. Soc. B* **286**, 20190050. (doi:10.1098/rspb.2019.0050)
44. Duman JG. 2015 Animal ice-binding (antifreeze) proteins and glycolipids: an overview with emphasis on physiological function. *J. Exp. Biol.* **218**, 1846–1855. (doi:10.1242/jeb.116905)
45. Bar Dolev M, Braslavsky I, Davies PL. 2016 Ice-binding proteins and their function. *Annu. Rev. Biochem.* **85**, 515–542. (doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014546)
46. King AM, MacRae TH. 2015 Insect heat shock proteins during stress and diapause. *Annu. Rev. Entomol.* **60**, 59–75. (doi:10.1146/annurev-ento-011613-162107)
47. Tunnadiffe A, Wise MJ. 2007 The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften* **94**, 791–812. (doi:10.1007/s00114-007-0254-y)
48. Hand SC, Menze MA, Toner M, Boswell L, Moore D. 2011 LEA proteins during water stress: not just for plants anymore. *Annu. Rev. Physiol.* **73**, 115–134. (doi:10.1146/annurev-physiol-012110-142203)
49. Bahmdorff S, Tunnadiffe A, Wise MJ, McGee B, Holmstrup M, Loeschke V. 2009 Bioinformatics and protein expression analyses implicate LEA proteins in the drought response of Collembola. *J. Insect Physiol.* **55**, 210–217. (doi:10.1016/j.jinsphys.2008.11.010)
50. Li S, Chakraborty N, Borcar A, Menze MA, Toner M, Hand SC. 2012 Late embryogenesis abundant proteins protect human hepatoma cells during acute desiccation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 20 859–20 864. (doi:10.1073/pnas.1214893109)
51. Ma X *et al.* 2005 A small stress protein acts synergistically with trehalose to confer desiccation tolerance on mammalian cells. *Cryobiology* **51**, 15–28. (doi:10.1016/j.cryobiol.2005.04.007)
52. Viner RI, Clegg JS. 2001 Influence of trehalose on the molecular chaperone activity of p26, a small heat shock/ $\alpha$ -crystallin protein. *Cell Stress Chaperon* **6**, 126. (doi:10.1379/1466-1268(2001)006<0126: IOTOTM>2.0.CO;2)
53. Kang J-S, Raymond JA. 2004 Reduction of freeze-thaw-induced hemolysis of red blood cells by an algal ice-binding protein. *Cryoletters* **25**, 307–310.
54. Goyal K, Walton LJ, Tunnadiffe A. 2005 LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochem. J.* **388**, 151–157. (doi:10.1042/BJ20041931)



55. Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. 1999 Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1720–1730. (doi:10.1128/MCB.19.3.1720)
56. Riihimaa AJ, Kimura MT. 1988 A mutant strain of *Chymomyza costata* (Diptera: Drosophilidae) insensitive to diapause-inducing action of photoperiod. *Physiol. Entomol.* **13**, 441–445. (doi:10.1111/j.1365-3032.1988.tb01128.x)
57. Kostal V, Noguchi H, Shimada K, Hayakawa Y. 1998 Developmental changes in dopamine levels in larvae of the fly *Chymomyza costata*: comparison between wild-type and mutant-nondiapause strains. *J. Insect Physiol.* **44**, 605–614. (doi:10.1016/S0022-1910(98)00043-2)
58. Košťál V, Shimada K, Hayakawa Y. 2000 Induction and development of winter larval diapause in a drosophilid fly, *Chymomyza costata*. *J. Insect Physiol.* **46**, 417–428. (doi:10.1016/S0022-1910(99)00124-9)
59. Andrews S. 2018 FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. See <https://github.com/s-andrews/fastqc>.
60. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014 Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**, 2114–2120. (doi:10.1093/bioinformatics/btu170)
61. Goecks J, Nekrutenko A, Taylor J. 2010 Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biol.* **11**, R86. (doi:10.1186/gb-2010-11-8-r86)
62. Langmead B, Salzberg SL. 2012 Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Meth.* **9**, 357–359. (doi:10.1038/nmeth.1923)
63. Poupardin R, Schöttner K, Korbelová J, Provazník J, Doležel D, Pavlinic D, Beněš V, Košťál V. 2015 Early transcriptional events linked to induction of diapause revealed by RNAseq in larvae of drosophilid fly, *Chymomyza costata*. *BMC Genomics* **16**, 720. (doi:10.1186/s12864-015-1907-4)
64. Trapnell C *et al.* 2012 Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat. Protoc.* **7**, 562–578. (doi:10.1038/nprot.2012.016)
65. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. 2010 edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**, 139–140. (doi:10.1093/bioinformatics/btp616)
66. R Core Team. 2018 *R: a language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
67. Risso D, Ngai J, Speed TP, Dudoit S. 2014 Normalization of RNA-seq data using factor analysis of control genes or samples. *Nat. Biotechnol.* **32**, 896–902. (doi:10.1038/nbt.2931)
68. Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M. 2005 Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* **21**, 3674–3676. (doi:10.1093/bioinformatics/bti610)
69. Kanehisa M, Goto S. 2000 KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* **28**, 27–30. (doi:10.1093/nar/28.1.27)
70. Moriya Y, Itoh M, Okuda S, Yoshizawa AC, Kanehisa M. 2007 KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic Acids Res.* **35**, W182–W185. (doi:10.1093/nar/gkm321)
71. Luo W, Brouwer C. 2013 Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. *Bioinformatics* **29**, 1830–1831. (doi:10.1093/bioinformatics/btt285)
72. Luo W, Friedman MS, Shedden K, Hankenson KD, Woolf PJ. 2009 GAGE: generally applicable gene set enrichment for pathway analysis. *BMC Bioinf.* **10**, 1. (doi:10.1016/j.gpb.2016.12.005)
73. Dykes IM, Emanuelli C. 2017 Transcriptional and post-transcriptional gene regulation by long non-coding RNA. *Genom. Proteom. Bioinf.* **15**, 177–186. (doi:10.1016/j.gpb.2016.12.005)
74. Suarez RK, Moyes CD. 2012 Metabolism in the age of 'omes'. *J. Exp. Biol.* **215**, 2351–2357. (doi:10.1242/jeb.059725)
75. Colinet H, Overgaard J, Com E, Sørensen JG. 2013 Proteomic profiling of thermal acclimation in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **43**, 352–365. (doi:10.1016/j.ibmb.2013.01.006)
76. Zhang G, Storey JM, Storey KB. 2011 Chaperone proteins and winter survival by a freeze tolerant insect. *J. Insect Physiol.* **57**, 1115–1122. (doi:10.1016/j.jinsphys.2011.02.016)
77. Bhatnagar BS, Bogner RH, Pikal MJ. 2007 Protein stability during freezing: separation of stresses and mechanisms of protein stabilization. *Pharm. Dev. Technol.* **12**, 505–523. (doi:10.1080/10837450701481157)
78. Ragland GJ, Denlinger DL, Hahn DA. 2010 Mechanisms of suspended animation are revealed by transcript profiling of diapause in the flesh fly. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 14909–14914. (doi:10.1073/pnas.1007075107)
79. Rinehart JP, Yocum GD, Denlinger DL. 2000 Developmental upregulation of inducible hsp70 transcripts, but not the cognate form, during pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **30**, 515–521. (doi:10.1016/S0965-1748(00)00021-7)
80. Strudwick N, Schröder M. 2007 The unfolded protein response. In *Systems biology* (eds M Al-Rubeai, M Fussenegger), pp. 69–155. Berlin, Germany: Springer.
81. Gong WJ, Golic KG. 2006 Loss of Hsp70 in *Drosophila* is pleiotropic, with effects on thermotolerance, recovery from heat shock and neurodegeneration. *Genetics* **172**, 275–286. (doi:10.1534/genetics.105.048793)
82. Höhfeld J, Cyr DM, Patterson C. 2001 From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation. *EMBO Rep.* **2**, 885–890. (doi:10.1093/embo-reports/kve206)
83. McDonough H, Patterson C. 2003 CHIP: a link between the chaperone and proteasome systems. *Cell Stress Chaperon.* **8**, 303. (doi:10.1379/1466-1268(2003)008<0303:CALBTC>2.0.CO;2)
84. Alderson TR, Kim JH, Markley JL. 2016 Dynamical structures of Hsp70 and Hsp70-Hsp40 complexes. *Structure* **24**, 1014–1030. (doi:10.1016/j.str.2016.05.011)
85. Qiu X-B, Shao Y-M, Miao S, Wang L. 2006 The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 2560–2570. (doi:10.1007/s00018-006-6192-6)
86. Dai Q *et al.* 2005 Regulation of the cytoplasmic quality control protein degradation pathway by BAG2. *J. Biol. Chem.* **280**, 38 673–38 681. (doi:10.1074/jbc.M507986200)
87. Pavel M *et al.* 2016 CCT complex restricts neuropathogenic protein aggregation via autophagy. *Nat. Commun.* **7**, 13821. (doi:10.1038/ncomms13821)
88. Des Marteaux LE, Stinziano JR, Sinclair BJ. 2018 Effects of cold acclimation on rectal macromorphology, ultrastructure, and cytoskeletal stability in *Gryllus pennsylvanicus* crickets. *J. Insect Physiol.* **104**, 15–24. (doi:10.1016/j.jinsphys.2017.11.004)
89. Des Marteaux LE, Štětina T, Košťál V. 2018 Insect fat body cell morphology and response to cold stress is modulated by acclimation. *J. Exp. Biol.* **221**, jeb.189647. (doi:10.1242/jeb.189647)
90. Kim M, Robich RM, Rinehart JP, Denlinger DL. 2006 Upregulation of two actin genes and redistribution of actin during diapause and cold stress in the northern house mosquito, *Culex pipiens*. *J. Insect Physiol.* **52**, 1226–1233. (doi:10.1016/j.jinsphys.2006.09.007)
91. Kayukawa T, Ishikawa Y. 2009 Chaperonin contributes to cold hardiness of the onion maggot *Delia antiqua* through repression of depolymerization of actin at low temperatures. *PLoS ONE* **4**, e8277. (doi:10.1371/journal.pone.0008277)
92. MacMillan HA, Yerushalmi GY, Jonusaitis S, Kelly SP, Donini A. 2017 Thermal acclimation mitigates cold-induced paracellular leak from the *Drosophila* gut. *Sci. Rep.* **7**, 8807. (doi:10.1038/s41598-017-08926-7)
93. Vos MJ, Carra S, Kanon B, Bosveld F, Klauke K, Sibon OC, Kampinga HH. 2016 Specific protein homeostatic functions of small heat-shock proteins increase lifespan. *Aging Cell* **15**, 217–226. (doi:10.1111/acel.12422)
94. Morrow G, Heikkilä JJ, Tanguay RM. 2006 Differences in the chaperone-like activities of the four main small heat shock proteins of *Drosophila melanogaster*. *Cell Stress Chaperon* **11**, 51. (doi:10.1379/CSC-166.1)
95. Morrow G, Le Pécheur M, Tanguay RM. 2016 *Drosophila melanogaster* mitochondrial Hsp22: a role in resistance to oxidative stress, aging and the mitochondrial unfolding protein response. *Biogerontology* **17**, 61–70. (doi:10.1007/s10522-015-9591-y)
96. Amin J, Mestrl R, Voellmy R. 1991 Genes for *Drosophila* small heat shock proteins are regulated differently by ecdysterone. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 5937–5944. (doi:10.1128/MCB.11.12.5937)

97. Mason P, Hall L, Gausz J. 1984 The expression of heat shock genes during normal development in *Drosophila melanogaster* (heat shock/abundant transcripts/developmental regulation). *Mol. Gen. Genet.* **194**, 73–78. (doi:10.1007/BF00383500)
98. Lepesant J, Levine M, Garen A, Lepesant-Kejzarova J, Rat L, Somme-Martin G. 1982 Developmentally regulated gene expression in *Drosophila* larval fat bodies. *J. Mol. Appl. Genet.* **1**, 371–383. (doi:10.1016/b978-0-12-068350-5.50020-x)
99. Chakraborty R, Li Y, Zhou L, Golic KG. 2015 Corp regulates P53 in *Drosophila melanogaster* via a negative feedback loop. *PLoS Genet.* **11**, e1005400. (doi:10.1371/journal.pgen.1005400)
100. Drapeau MD. 2001 The family of yellow-related *Drosophila melanogaster* proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**, 611–613. (doi:10.1006/bbrc.2001.4391)
101. Shearer PW, West JD, Walton VM, Brown PH, Svetec N, Chiu JC. 2016 Seasonal cues induce phenotypic plasticity of *Drosophila suzukii* to enhance winter survival. *BMC Ecol.* **16**, 11. (doi:10.1186/s12898-016-0070-3)

## PROCEEDINGS B

royalsocietypublishing.org/journal/rspb

## Research



**Cite this article:** Hůla P, Moos M, Des Marteaux L, Šimek P, Košťál V. 2022 Insect cross-tolerance to freezing and drought stress: role of metabolic rearrangement. *Proc. R. Soc. B* **289**: 20220308.  
<https://doi.org/10.1098/rspb.2022.0308>

Received: 17 February 2022  
 Accepted: 12 May 2022

**Subject Category:**  
 Development and physiology

**Subject Areas:**  
 physiology

**Keywords:**  
 cross-tolerance, cold, freezing, drought, metabolism, cytoprotectants

**Author for correspondence:**  
 Vladimír Košťál  
 e-mail: [kostal@entu.cas.cz](mailto:kostal@entu.cas.cz)

<sup>†</sup>Current address: Agriculture and Agri-Food Canada, Harrow Research and Development Centre, Harrow, Ontario, Canada.

Electronic supplementary material is available online at <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.c.6006457>.

THE ROYAL SOCIETY  
 PUBLISHING

## Insect cross-tolerance to freezing and drought stress: role of metabolic rearrangement

Petr Hůla<sup>1,2</sup>, Martin Moos<sup>1</sup>, Lauren Des Marteaux<sup>1,†</sup>, Petr Šimek<sup>1</sup> and Vladimír Košťál<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biology Centre, Czech Academy of Sciences, Institute of Entomology, České Budějovice, Czech Republic

<sup>2</sup>Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

LDM, 0000-0002-0461-2704; VK, 0000-0002-4994-5123

The accumulation of trehalose has been suggested as a mechanism underlying insect cross-tolerance to cold/freezing and drought. Here we show that exposing diapausing larvae of the drosophilid fly, *Chymomyza costata* to dry conditions significantly stimulates their freeze tolerance. It does not, however, improve their tolerance to desiccation, nor does it significantly affect trehalose concentrations. Next, we use metabolomics to compare the complex alterations to intermediary metabolism pathways in response to three environmental factors with different ecological meanings: environmental drought (an environmental *stressor* causing mortality), decreasing ambient temperatures (an acclimation *stimulus* for improvement of cold hardiness), and short days (an environmental *signal* inducing diapause). We show that all three factors trigger qualitatively similar metabolic rearrangement and a similar phenotypic outcome—improved larval freeze tolerance. The similarities in metabolic response include (but are not restricted to) the accumulation of typical compatible solutes and the accumulation of energy-rich molecules (phosphagens). Based on these results, we suggest that transition to metabolic suppression (a state in which chemical energy demand is relatively low but need for stabilization of macromolecules is high) represents a common axis of metabolic pathway reorganization towards accumulation of non-toxic cytoprotective compounds, which in turn stimulates larval freeze tolerance.

### 1. Introduction

In environmental physiology, cross-tolerance is defined as an interaction between physiological responses to different stressors which elicit common mechanisms of cellular protection [1]. From an ecological perspective, the concept of cross-tolerance is a logically clear and robust explanation for evolutionary adaptation of organisms exposed to multiple stressors simultaneously in nature. Deeper analysis of the underlying physiological principles would shed light on evolutionary histories of adaptation to environmental stress and allow us to predict future responses to multiple stressors in a changing climate [1–3].

Overwintering insects are often exposed to two stressors simultaneously; low temperatures and low availability of liquid water [4,5]. Moreover, freeze-tolerant insects regulate (and often actively induce) extracellular ice formation in their bodies when exposed to subzero temperatures [6,7]. This extracellular freezing concentrates the liquids surrounding cells and, consequently, causes osmotic outflow of water from cells (termed freeze-dehydration) [8–10]. Ring & Danks [11] hypothesized that physiological responses to cold/freezing and drying may overlap and represent an exemplary case of insect cross-tolerance. Indeed, improvement of freeze tolerance in response to desiccation was observed in at least three insect species: larvae of the sub-Antarctic moth,

© 2022 The Author(s) Published by the Royal Society. All rights reserved.

*Pringleophaga marioni* [12]; larvae of the goldenrod gall fly, *Eurosta solidaginis* [13]; and larvae of the Antarctic midge, *Belgica antarctica* [14,15].

The malt fly, *Chymomyza costata* is among the most northerly occurring drosophilids, inhabiting holarctic cold temperate and subpolar regions. It is, for instance, by far the most common drosophilid species found in Finland north of the Arctic circle [16]. Larvae of *C. costata* are extremely freeze tolerant and can even survive after cryopreservation in liquid nitrogen for at least 18 months [17–19]. Although the microhabitats where larvae of approximately 60 *Chymomyza* species dwell are poorly known, they are (as in other drosophilids) probably associated with decaying plant material [20–22]. The adults are attracted to cut wood, and larvae probably live and overwinter under the bark of fallen trees, feeding on decaying phloem rich in fungal mycelia [20] (personal communication, Kimio Shimada, Hokkaido University, Sapporo, Japan). Such microhabitats are often exposed to severe frosts during Arctic and temperate winters, and in theory may also suffer from transient evaporative desiccation. This prompted us to assess the cross-tolerance capacity of *C. costata* larvae to drought and cold/freezing, with a focus on the physiological mechanisms.

Several physiological changes were proposed to be involved in cross-tolerance to freezing and drought stress based on correlative evidence: (i) upregulation of molecular chaperone proteins, specifically heat shock proteins (HSPs) [23] or late embryogenesis abundant-like (LEA-like) proteins [24]; (ii) restructuring of phospholipid bilayers in animal membranes [25]; (iii) stimulated activity of antioxidant and detoxification systems [26]; (iv) upregulation of aquaporins [27]; and particularly (v) biosynthesis of the disaccharide trehalose [28,29]. The accumulation of trehalose has been ubiquitously reported from dehydration-stressed organisms across multiple taxa [30,31] including freeze-tolerant insects [32,33]. Trehalose, in addition to being the primary insect blood sugar [34], may act more or less as an inert regulator of osmotic pressure (osmolyte) in the dehydrating cell [35], but trehalose is also famous for its exceptional capacity to stabilize proteins and biological membranes at low water activities [36,37] and for its ability to stimulate transition of liquid solutions to the amorphous glass phase [38]. In response to various stressors, many organisms accumulate trehalose along with a set of other sugars, polyols and amino acids. These compounds are collectively known as compatible or compensatory solutes, having both weak cytotoxic effects and non-specific (osmotic) and specific cytoprotective effects (stabilization of macromolecules) [35,39,40]. The hypothesis put forth by Pullin [41] posits that the generally observed accumulation of sugars and other non-toxic solutes might be a byproduct of metabolic suppression-linked alterations to insect intermediary metabolic pathways.

Although the conceptual framework of cross-tolerance to cold, freezing and drought stresses in insects is compelling, direct evidence for commonality of underlying physiological mechanisms is scant. Here, we analyze the metabolic response of *C. costata* larvae to drought. First, we show that exposure to drought improves larval freeze tolerance. Next, we show that while drought exposure is not associated with massive accumulation of trehalose, it does induce accumulation of three amino acids (proline, glutamine and asparagine) which also reach high concentrations in cold-acclimated larvae

[18,42]. Last, we show that exposure to drought, acclimation to cold, and entry into diapause cause qualitatively similar alterations to metabolic pathways. The accumulation of compatible solutes is observed in all three cases and is always accompanied by accumulation of phosphagens (ATP, GTP, 3-phosphoglycerate, phosphoenolpyruvate, phosphoarginine), suggesting that metabolic suppression, according to Pullin's hypothesis [41], might represent a common axis for reorganization of metabolic pathways in response to different environmental stimuli: drought, cold and short days—all eventually leading to improvement of larval freeze tolerance.

## 2. Material and methods

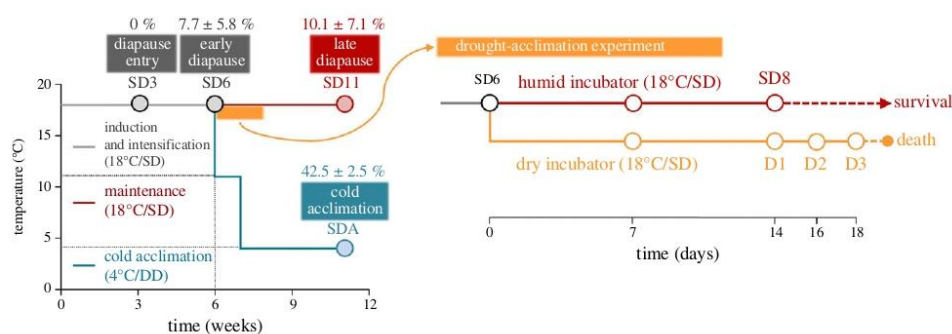
### (a) Insects and drought acclimation

A colony of *Chymomyza costata*, Sapporo strain [43], was reared on an artificial cornmeal-yeast-agar diet supplemented with ground malted barley in MIR154 incubators (Sanyo Electric, Osaka, Japan) as described previously [44,45]. Figure 1 shows the drought acclimation experiment in the context of our previous studies where we used several phenotypic variants of 3<sup>rd</sup> instar diapausing larvae: SD3, SD6, SD11 and SDA (for more explanation, see figure 1) that differ dramatically in freeze tolerance and survival after cryopreservation in liquid nitrogen [17–19,42,47]. In this study, we focus on the relatively short period during diapause maintenance at a high temperature (18°C) and short-day photoperiod to compare the metabolic responses of larvae exposed to humid and dry conditions. Samples of larval diet (approx. 50 mg) were taken for analysis of diet moisture content (fresh mass – dry mass after 3 days of drying at 65°C) and the larvae were sampled for cryopreservation assays and for metabolomic analyses as described below and schematically shown in figure 1 (open circles).

All experimental larvae came from eggs laid by a single large group of *C. costata* adults. The young larvae were reared under diapause-promoting conditions (18°C/SD) in a 'humid' MIR154 incubator (equipped with a tray with distilled water and folded filter paper evaporators). When the larvae were three weeks old (stage SD3 according to figure 1), they were extracted from the diet and only large specimens were selected to ensure 'synchrony' of the developmental stage. The synchronized larvae were divided into groups of exactly 60 larvae per vial onto 3 g of freshly prepared larval diet and returned to the humid incubator. Such handling ensured that initial conditions were closely similar for all larvae. The larvae were first sampled at six weeks of age (SD6). The remaining vials were then randomly divided between the humid and 'dry' incubators. The dry MIR154 incubator (18°C/SD) was equipped with one tablet (450 g) of a desiccant Aero360° (Ceresit, Henkel, Czech Republic). The temperature inside the larval diet and relative humidity of the air inside both incubators was monitored using a Temperature-humidity logger S3121-2 (Comet, Czech Republic) (electronic supplementary material, figure S1).

### (b) Freezing and cryopreservation survival assays

Larvae were sampled from humid (SD6, SD8) and dry incubators (D1, D3) and frozen using a previously developed optimal freezing and cryopreservation protocol [18]. The protocol consisted of six steps set in a Ministat 240 programmable cryostat (Huber, Offenburg, Germany): (i) 20 min of larval manipulation at 0°C (washing larvae out of the diet, dividing into groups of 20 specimens, and placing them into 3 ml plastic tubes between two layers of moist cellulose); (ii) slow pre-freezing to –30°C (with a small ice crystal added on top of the moist cellulose) for 300 min (cooling rate, 0.1°C min<sup>-1</sup>); (iii) keeping larvae at either



**Figure 1.** Phenotypic variants of *Chymomyza costata* larvae and the drought-acclimation experiment. The drought-acclimation experiment schematic (right) including three successive stages of drought stress (D1, D2 and D3) is shown in the context of our earlier studies on different acclimation/phenotypic variants of *C. costata* (left). All larvae were reared under short day photoperiod (SD, 12 h light : 12 h dark) which induces diapause. The phases of diapause development (according to [46]) are indicated by colored lines and rectangles (left): the phenotypic variants SD3 (diapause entry), SD6 (early diapause maintenance), SD11 (late diapause maintenance) and SDA (cold acclimation) differ dramatically in survival after cryopreservation in liquid nitrogen: the mean  $\pm$  s.d. % survival to the adult stage is shown for previously studied variants (according to [17–19]). Diet and larvae were sampled from humid and dry incubators as indicated by open circles (right). The exact temperature and air-humidity conditions in humid and dry incubators are shown in electronic supplementary material, figure S1. (Online version in colour.)

–30°C for 60 min or plunging them into liquid nitrogen for 60 min (cooling rate, 2–4°C s<sup>-1</sup>); (iv) transfer from liquid nitrogen to –30°C (heating rate, 1–2°C s<sup>-1</sup>); and (v) heating from –30°C to +5°C over 60 min (heating rate, 0.6°C min<sup>-1</sup>); (vi) melting at +5°C for 10 min. Adding a small ice crystal at the beginning of step (ii) induces inoculative internal freezing in larvae [18]. Upon melting (end of step vi) the moist cellulose was unwrapped and transferred, together with larvae, to fresh diet. The following day, the cellulose was removed and larval survival was scored considering larvae showing spontaneous movements as alive. The ultimate criterion for survival was the ability to metamorphose into adults within 42 days at constant 18°C and long day (L16 h : D8 h) conditions. Differences between treatments for survival to the adult stage were assessed using contingency tables and two-tailed Fisher's exact tests (Prism v. 6.07, GraphPad Software San Diego, USA).

### (c) Metabolomics and statistics

Whole *C. costata* larvae (pools of five larvae in each of four biological replicates) were sampled from humid (SD6, SD8) and dry incubators (D1, D2, D3). The larvae were weighed to obtain fresh mass, plunged into liquid nitrogen, and stored at –80°C until analysis. Details on extraction of metabolites from larval samples and analysis using four different mass spectrometry-based (MS) analytical platforms as described previously [42,48] are shown in the electronic supplementary material.

A subset of 36 metabolites were subjected to *absolute* quantitative analysis using a standard calibration curve method, which is important when searching for compatible solutes known to operate at relatively high absolute concentrations. The results were expressed in nmol mg<sup>-1</sup> FM and subjected to unconstrained principal component analysis (PCA; Canoco v. 5.10 [49]) in order to reveal clustering of samples and treatments and to identify major drivers of the metabolic response to drought acclimation. The data were not transformed prior to statistics, making the analysis more sensitive to absolute concentrations. The means were centered (a total mean was subtracted from each value), and the variations around means were standardized (each value was divided by a total mean standard deviation). In addition, six select metabolites (proline, glutamine, asparagine, leucine, trehalose and sorbitol) were subjected to one-way

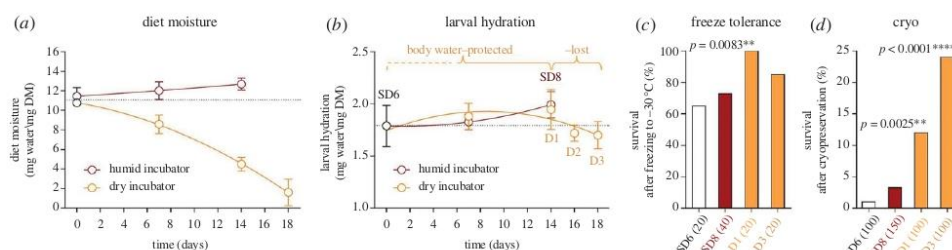
ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test (GraphPad Prism v. 6.07).

Another subset of 60 metabolites were subjected to *relative* quantification using the areas under respective chromatographic peaks. This analysis is primarily sensitive to fold-differences between treatments. The results were expressed as log<sub>2</sub>-fold changes in peak areas for treatments (SD8, D1, D2, D3) compared to the initial value (SD6). In order to reveal general response patterns of whole metabolic pathways to treatments, the results were mapped onto a schematic map of intermediary metabolism.

## 3. Results

### (a) Exposure to dry conditions stimulates freeze tolerance

The larval diet gradually lost moisture in the dry incubator while diet moisture remained practically constant in the humid incubator (figure 2*a*). By day 18 (corresponding to larval sample D3), the diet had lost approximately 80% of its original water content and its sensory character changed from a semiliquid mash to a very dry paste. By contrast to the dramatic loss of water from the diet, larvae in the dry incubator maintained practically constant body water content (protected body water) at least for 14 days (figure 2*b*). A statistically insignificant trend of larval water loss occurred only between days 14 and 18 (from D1 to D3). During sampling, we noticed that all larvae were alive on day 14 (D1), a few dead larvae were seen on day 16 (D2), many were dead on day 18 (D3), and all larvae were dead on day 20 (no sampling possible). Although we have not collected exact quantitative data on larval mortality, it is obvious that *C. costata* larvae are highly sensitive to drying of their environment and have only minimal desiccation tolerance; larvae die upon losing approximately 5% of their body water content. Apparently, *C. costata* larvae are not evolutionarily adapted to cope with the eventuality of drought stress and show no drought-acclimation response. This high sensitivity to drying made further experimentation on larval drought acclimation impossible.



**Figure 2.** Effect of drought exposure on freeze tolerance in *Chymomyza costata* larvae. (a) Water content in the larval diet decreased steeply in the dry incubator during the drought-acclimation experiment, but remained relatively high in the humid incubator; (b) the water contents in larval bodies remained similar in both incubators (ANOVA did not detect any influence of the time of sampling on larval hydration: humid:  $F_{2,9} = 2.376$ ;  $p = 0.337$ ; dry:  $F_{4,15} = 1.932$ ;  $p = 0.159$ ; GraphPad Prism v. 6.07) although the larvae in the dry incubator showed a trend of body water loss corresponding with rapidly increasing mortality between days 14 and 18. No mortality was observed in the humid incubator (larvae can survive for months in a moist diet); (c) survival until the adult stage after slow inoculative freezing of the larvae to  $-30^{\circ}\text{C}$ ; and (d) cryo, survival after plunging the slowly pre-frozen larvae into liquid nitrogen for 1 h (numbers in parentheses show the numbers of larvae in the assay). The differences in survival percentage between each treatment (SD8, D1, D3) and initial state (SD6) were assessed using Chi-square Fisher's exact tests (GraphPad Prism v. 6.07) and significant  $p$ -values are shown. (Online version in colour.)

Diapausing larvae exposed to dry conditions showed a highly significant improvement in tolerance to freezing and especially to cryopreservation stress (figure 2c,d). Only 1% (SD6) and 3.3% (SD8) of larvae reared in the humid incubator survived cryopreservation stress, while 12% (D1) and 24% (D3) of larvae reared in the dry incubator were able to survive the same stress. The larvae of the same age that were sampled from humid and dry incubators (i.e. SD8 and D1) had practically equal water contents, yet differed significantly in freeze tolerance (Fisher's exact test,  $p = 0.0108^*$ ) and cryopreservation tolerance (Fisher's exact test,  $p = 0.0010^{**}$ ).

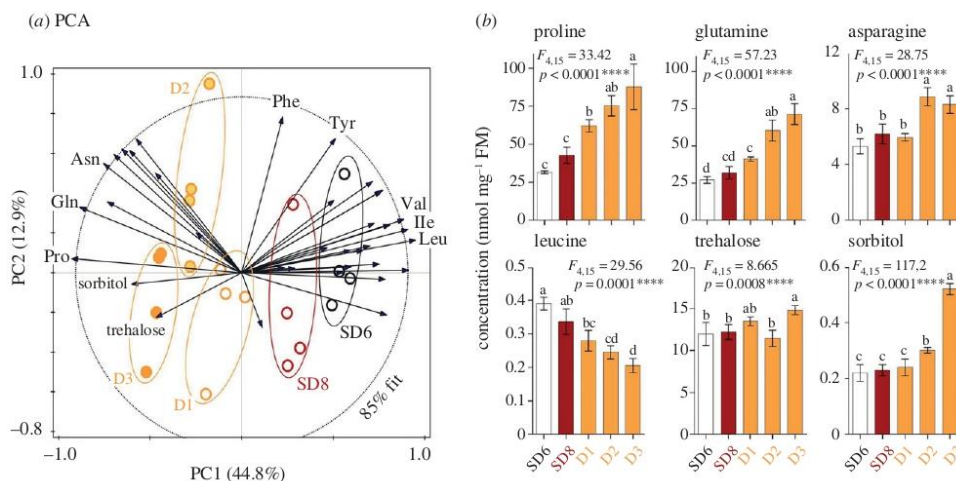
### (b) Exposure to dry conditions causes metabolic rearrangement

The detailed results of absolute quantification of 36 metabolites are shown in electronic supplementary material, table S1 and figure 3a shows PCA results for the whole dataset (for easier visualization, different treatments were highlighted using coloured ellipses). The PC1 axis explains 44.8% of the cumulative variation in the model. A distinct clustering of treatments along the PC1 axis demonstrates differences in the global metabolic composition among treatments. The variation of results within treatments is reflected as a spread of data points along the PC2 axis (12.9% of variation explained). Three amino acids (proline, glutamine and asparagine) were the most important positive correlates, while three other amino acids (leucine, isoleucine and valine) were the most important negative correlates of the overall metabolic response to dry conditions. There was a notable difference in the absolute concentrations between two amino acid groups: the mean sum concentration of Pro + Gln + Asn increased from 61.0 to 167.4 nmol  $\text{mg}^{-1}$  FM, while the mean sum of Leu + Ile + Val decreased from 1.5 to 0.8 nmol  $\text{mg}^{-1}$  FM (electronic supplementary material, table S1). Examples of important drivers of the metabolic response are shown in figure 3b. We also depict the changes in trehalose and sorbitol concentrations as their loading vectors are tightly associated with the cluster of D3 larvae. Moreover, trehalose is considered as a central element of drought acclimation in many organisms. The differences in trehalose concentrations were relatively small, although the

1.2-fold increase of trehalose concentration between SD6 and D3 was statistically significant.

### (c) Drought stress and short day length elicit similar metabolic rearrangements

The complete results of the relative quantification of 60 metabolites are shown in electronic supplementary material, table S2 while electronic supplementary material, figure S2 summarizes the results graphically. Three major messages can be derived from the relative quantification. First, the accumulations of proline, glutamine and asparagine (as well as a moderate accumulation of trehalose) during drought stress were confirmed in D3 larvae. Second, different high-energy molecules (phosphagens) such as ATP, GTP, phosphoarginine, 3-phosphoglycerate and phosphoenolpyruvate were accumulated during drought stress. This was countered by decreasing concentrations of ADP, AMP, GDP and GMP, suggesting that energy expenditure was significantly reduced during drought stress. Third, there was a striking and broad qualitative similarity in the complex metabolic rearrangements linked to diapause maintenance (transition from SD6 to SD8, a response to short day length) and drought stress (transition from SD6 to D3). The heat map (electronic supplementary material, table S2) shows that the trends of changes (upregulation versus downregulation) to the two treatments share the same direction (colour, quality) and differ only in intensity of colour (quantity). Using the arbitrary threshold of 1.5-fold (i.e.  $0.58 \log_2$ -fold) to exclude the marginal differences, there is no single case where the trends of changes in response to short days and drought would go in opposite directions (electronic supplementary material, table S2). The similarity of metabolic responses to drought and short days was broader than just the accumulation of three amino acids, trehalose and phosphagens. Concerted changes were also found in: (i) one carbon (methylation) metabolism (accumulations of serine and sarcosine countered by depletion of choline, glycine, methionine and cysteine); (ii) a trend towards depletion of non-essential amino acids valine, leucine and isoleucine countered by increasing lysine; (iii) activation of the pentose cycle suggested by accumulation of 6-phosphate gluconate, which produced reducing power (NADPH)



**Figure 3.** Absolute quantification of 36 select metabolites in *Chymomyza costata* larvae. (a) A principal component analysis shows distinct clustering of samples (circles) according to treatments (highlighted using coloured ellipses). The loading vectors (arrows) for all 36 metabolites are shown, while identities are shown for select metabolites only (more details in the text); (b) the differences in absolute concentrations of six select metabolites between various treatments of the drought-acclimation experiment were assessed by one-way ANOVA ( $F$ -statistics and  $p$ -values shown) followed by Bonferroni's multiple comparison test (columns flanked by different letters are significantly different). The complete metabolomics dataset is presented in electronic supplementary material, table S1. (Online version in colour.)

probably used for (iv) higher production of sorbitol from glucose or proline from pyrroline 5-carboxylate (electronic supplementary material, figure S2).

#### 4. Discussion

Here, we show that the drought-exposed diapausing larvae of *C. costata* do not increase their tolerance to desiccation but do increase their tolerance to another environmental stressor—freezing. Further, we show that drought-exposed diapausing larvae accumulate specific metabolites (trehalose, sorbitol, proline, glutamine and asparagine) that are collectively known as compatible solutes [35]. Although this accumulation response was not sufficient to support drought tolerance, it might be one of the mechanisms underlying the increase of freeze tolerance in *C. costata* larvae. We will first discuss the potential physiological roles of trehalose and other compatible solutes in insect freeze tolerance. Next, we will discuss our results within the conceptual framework of cross-tolerance.

##### (a) Physiological mechanisms of cross-tolerance: roles of trehalose and other compatible solutes

The strongest piece of correlative evidence for the role of drought-induced trehalose accumulation in insect freeze tolerance comes from Benoit *et al.* [50]. They reported at least a 3-fold increase of trehalose content (from 6  $\mu\text{g mg}^{-1}$  DM to more than 18  $\mu\text{g mg}^{-1}$  DM) in the larvae of the midge *Belgica antarctica* during slow (5 days) desiccation at 98% RH and 4°C, when larvae lost approximately 50% of their body water. Importantly, slow desiccation also improved larval survival at  $-15^{\circ}\text{C}$  (from less than 30% to roughly 90% survival). Furthermore, injecting trehalose into larvae increased their body trehalose content by 8.6  $\mu\text{g mg}^{-1}$  DM,

which was again associated with improved freeze tolerance (to approx. 55%) [50]. In *C. costata* larvae, the drought-induced change in trehalose content was relatively small (1.2-fold), from 11.4  $\mu\text{g mg}^{-1}$  DM to 13.7  $\mu\text{g mg}^{-1}$  DM (note that here we use  $\mu\text{g mg}^{-1}$  DM units in order to ease the comparison to *B. antarctica* data). The resulting post-acclimation concentrations of trehalose were, however, broadly similar in two species; only 1.3-fold higher in *B. antarctica* than in *C. costata*. In addition, we showed previously that trehalose significantly accumulates in *C. costata* larvae in response to cold acclimation and supports freeze tolerance as part of a cryoprotectant mixture [17,42,48]. These results leave space for reasonable speculation that the relatively high 'constitutive' concentration of trehalose (despite its weak accumulation response to drought) at least partly contributes to high freeze tolerance of *C. costata* larvae.

In addition to very moderate accumulation of trehalose, the drought-exposed diapausing *C. costata* larvae strongly accumulated amino acids proline and glutamine. For proline, the capacity to serve as a potent cryoprotectant is well documented [17,18,51–55]. Glutamine has been reported as a beneficial additive in mixtures of protective agents used to cryopreserve sperm of different mammals [46,56]. The final levels of the three most concentrated molecules in drought-stressed (D3) larvae were: proline, 88  $\text{nmol mg}^{-1}$  FM; glutamine, 71  $\text{nmol mg}^{-1}$  FM; and trehalose, 14.8  $\text{nmol mg}^{-1}$  FM. The same molecules were previously detected as the three most concentrated components of a cryoprotective mixture accumulated by the extremely freeze-tolerant phenotype—diapausing cold-acclimated larvae (SDA; see figure 1a). The concentrations in SDA larvae reached 236; 17; and 36  $\text{nmol mg}^{-1}$  FM for proline, glutamine and trehalose, respectively, in whole body [18] or 313, 55 and 108  $\text{mmol l}^{-1}$  in haemolymph [42]. The drought- and cold-exposed diapausing larvae thus accumulated the same molecules yet in different ratios and different final amounts.

Whether and how the composition of the cryoprotective mixture influences the larval freeze tolerance *in vivo* is currently unknown. The investigation into mechanisms *in vivo* is hindered by the great complexity where individual cryoprotectants may interact differently and where multiple adaptive mechanisms in addition to accumulation of cryoprotectants are involved [33,42,57,58]. It is true, however, that freeze-tolerant organisms (including insects) often accumulate cryoprotective mixtures in which the different cryoprotective molecules might in theory either be interchangeable or may play specific roles [7,57,59]. Based on theory, results of *in vitro* experiments with cryoprotective molecules and physico-chemical and thermodynamic modelling of their interactions with water and macromolecules (references to relevant studies will follow) lead us to speculate that proline, glutamine and trehalose might be interchangeable in the following cryoprotective functions: (i) all three molecules can serve as osmolytes reducing the ice fraction and, thereby, the extent of freeze-dehydration at any given subzero temperature [8,10]; and (ii) all three molecules are preferentially excluded from the vicinity of proteins and phospholipid bilayers, which renders these macromolecular structures preferentially hydrated and less prone to denaturation (proteins) or phase transition (membranes) in cold or at decreasing water activity associated with partial loss of water during freeze-dehydration [60]. Other cryoprotective functions are linked to specific molecules. Trehalose [38], but not proline or glutamine [42,61], stimulates transition of liquid solutions to an amorphous glassy phase during freezing, which protects macromolecules against unwanted transitions such as protein unfolding [62]. Proline at high concentrations strongly hydrogen-bonds with water, together forming a dense viscoelastic liquid [63–65], which may help to protect the cells stressed by freeze-drying [42,66]. Although all three molecules may theoretically act as antioxidants, this role was specifically mentioned in the case of glutamine and cryopreservation of mammalian sperm [67].

### (b) Conceptual framework of cross-tolerance

Conceptually, two types of coordinated physiological response to different environmental stressors were distinguished by Sinclair *et al.* [1]: cross-tolerance and cross-talk (for more explanations, see electronic supplementary material, figure S3A, B). As *C. costata* larvae do not tolerate loss of body water caused by environmental drought, they do not represent a canonical example of cross-tolerance to cold and drought. Despite sharing a common aspect of liquid water loss, freeze-dehydration and desiccation stresses may differ significantly in other aspects and may therefore require specific physiological adaptations in addition to some 'overlapping adaptations' (e.g. the accumulation of compatible solutes) as proposed by [11].

Comparing the results of the present work with our previous metabolomics studies on *C. costata* [18,42,48] we noticed that the diapausing larvae exhibit strikingly similar metabolic rearrangements in response to environmental drying (this study), cold stimulus [18,42,48], and even to short day photoperiod (i.e. to the transition to diapause itself; this study and [48]). The three factors have different ecological meanings (drought is a *stressor* causing mortality; cold is an acclimation *stimulus* improving the cold hardiness;

short day photoperiod is an environmental *signal* inducing and maintaining diapause), yet they invariably caused similar phenotypic outcomes—the improvement of freeze tolerance. The major aspects of this uniform metabolic rearrangement were: (i) accumulation of compatible solutes including proline, glutamine, asparagine, trehalose and sorbitol; (ii) accumulation of different energy-rich molecules—phosphagens; (iii) depletion of the products of ATP hydrolysis. The observations (ii) and (iii) show that the changes in energy utilization (ATP turnover) were central to the metabolic rearrangement, which suggests that metabolic suppression could occur in response to all three factors. Although we did not directly measure the metabolic rate in *C. costata* larvae in this study, metabolic suppression is one of the hallmarks of insect diapause and animal dormancy in general [68]. Similarly, the metabolic suppression is highly likely to accompany the gradual decrease of ambient temperature from 18°C to 4°C (the cold-acclimation treatment). Metabolic suppression during drought exposure is suggested by the gradual increase in five different phosphagens countered by the decrease of products of ATP and GTP hydrolysis during three successive stages of drought stress. We speculate that metabolic suppression in drought-exposed larvae might be triggered by starvation caused by lack of sufficient quality (moisture) of the larval food.

The observation of striking similarities in metabolic (rearrangement and suppression) and phenotypic (freeze tolerance) responses to different environmental factors leads us to discuss how the case of *C. costata* fits into broader concepts of animal adaptation to harsh environmental conditions. In accordance with the hypothesis suggested by Pullin [41], we assume that general metabolic suppression might play a role as a common axis for reorganization of metabolic pathways in *C. costata* (electronic supplementary material, figure S3C). Pullin's hypothesis posits that the metabolic suppression linked to evolutionary ancient insect diapause in the tropics resulted in accumulation of relatively low concentrations of carbohydrates which may have initially been selectively neutral. Selection for enhanced carbohydrate accumulation may have first occurred in response to drought stress in tropical and sub-tropical regions but has more recently been selected for its cryoprotectant function in cold temperate and polar climates, allowing colonization of these regions [41]. Hence, Pullin's hypothesis implicitly presumes that the same molecules are involved in insects' protection against deleterious effects linked to drought and cold stresses. A similar assumption occurs also in the concepts of insect cross-tolerance formulated by Sinclair [1] or insect 'overlapping adaptation' to drought and cold stress formulated by Ring & Danks [11,28].

Extending the discussion beyond the realm of insects and broadening it to stressors other than drought and cold, the theory of compatible solutes (reviewed in [40], pp. 217–289) explains why diverse organisms across phyla exposed to various forms of stress always accumulate the same basic classes of compatible solutes—sugars, amino acids, and methylamines [39]. According to the theory, the same compounds are being repeatedly 'discovered' by convergent evolution for three interlocked reasons: (i) the *physico-chemical properties* of compatible solutes dictate their strong interactions with water molecules (high solubility), (ii) yet weak interactions with proteins and other macromolecules (low toxicity), and (iii) stabilization of macromolecules and cellular structures



against perturbing effects linked to dehydration, extreme temperatures, freezing and even high hydrostatic pressure [40,69] (see also §4 (a) for concrete examples of proposed physico-chemical mechanisms of freeze-tolerance). Under harsh environmental conditions, the compensation of physiological functions is often impossible, which leads to entry into some sort of dormancy where the need for chemical energy turnover is relatively low (metabolic suppression). By contrast, the need for stabilization of macromolecules against perturbing effects is relatively high (cytoprotection). This leads us to speculate that metabolic suppression and the accumulation of cytoprotectants might be metabolically interlocked or, at least, co-evolved in many independent cases where various organisms encountered environmental stress.

Overall, our observation of uniform metabolic rearrangement and accumulation of compatible solutes in diapausing *C. costata* larvae in response to three different environmental factors (drought, cold, short days) fits well into a broader picture that presents similar metabolic responses in organisms exposed to diverse environmental stresses. However, we also wish to point out the limits of too flatly interpreting the compatible solute accumulation. Despite significant

commonalities existing between cold/freezing and drought stresses, the nature of injuries brought on by these situations may still differ and, consequently, coping with each stressor may require acquisition of different (though partially overlapping) protective complexes.

**Data accessibility.** Additional data are provided in the electronic supplementary material [70].

**Authors' contributions.** P.H.: conceptualization, formal analysis, investigation, writing—review and editing; M.M.: formal analysis, investigation, writing—review and editing; L.D.M.: formal analysis, investigation, writing—review and editing; P.S.: supervision, validation, writing—review and editing; V.K.: conceptualization, formal analysis, funding acquisition, methodology, project administration, supervision, validation, visualization, writing—original draft, writing—review and editing.

All authors gave final approval for publication and agreed to be held accountable for the work performed therein.

**Conflict of interest declaration.** We declare we have no competing interests.

**Funding.** This study was supported by Grantová Agentura České Republiky (GACR) grant no. 19-13381S to V.K.

**Acknowledgements.** We would like to thank Irena Vacková and Jana Járová for maintenance of *C. costata* culture and processing samples for metabolomics, respectively.

## References

- Sindair B, Ferguson L, Salehipour-shirazi G, MacMillan H. 2013 Cross-tolerance and cross-talk in the cold: relating low temperatures to desiccation and immune stress in insects. *Integr. Comp. Biol.* **53**, 545. (doi:10.1093/icb/ict004)
- Kaunisto S, Ferguson LV, Sinclair BJ. 2016 Can we predict the effects of multiple stressors on insects in a changing climate? *Curr. Opin. Insect Sci.* **17**, 55–61. (doi:10.1016/j.cois.2016.07.001)
- Todgham AE, Stillman JH. 2013 Physiological responses to shifts in multiple environmental stressors: relevance in a changing world. *Integr. Comp. Biol.* **53**, 539–544. (doi:10.1093/icb/ict086)
- Danks H. 2000 Dehydration in dormant insects. *J. Insect Physiol.* **46**, 837–852. (doi:10.1016/S0022-1910(99)00204-8)
- Block W. 1996 Cold or drought—the lesser of two evils for terrestrial arthropods? *Eur. J. Entomol.* **93**, 325–340.
- Sindair BJ. 1999 Insect cold tolerance: How many kinds of frozen? *Eur. J. Entomol.* **96**, 157–164.
- Storey KB, Storey JM. 1988 Freeze tolerance in animals. *Physiol. Rev.* **68**, 27–84. (doi:10.1152/physrev.1988.68.1.27)
- Lovelock J. 1954 The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing. *Biochem. J.* **56**, 265–270. (doi:10.1042/bj0560265)
- Muldrew K, Acker JP, Elliott JA, McGann LE. 2004 The water to ice transition: implications for living cells. In *Life in the frozen state* (eds BJ Fuller, N Lane, EE Benson), pp. 93–134. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Mazur P. 1984 Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.* **247**, C125–C142. (doi:10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125)
- Ring R, Danks H. 1994 Desiccation and cryoprotection: overlapping adaptations. *Cryo-letters* **15**, 181–190.
- Sindair BJ, Chown SL. 2003 Rapid responses to high temperature and desiccation but not to low temperature in the freeze tolerant sub-Antarctic caterpillar *Pringleophaga marioni* (Lepidoptera, Tineidae). *J. Insect Physiol.* **49**, 45–52. (doi:10.1016/S0022-1910(02)00225-1)
- Levis NA, Yi S-X, Lee RE. 2012 Mild desiccation rapidly increases freeze tolerance of the goldenrod gall fly, *Eurosta solidaginis*: evidence for drought-induced rapid cold-hardening. *J. Exp. Biol.* **215**, 3768–3773. (doi:10.1242/jeb.076885)
- Hayward SA, Rinehart JP, Sandro LH, Lee RE, Denlinger DL. 2007 Slow dehydration promotes desiccation and freeze tolerance in the Antarctic midge *Belgica antarctica*. *J. Exp. Biol.* **210**, 836–844. (doi:10.1242/jeb.02714)
- Elnitsky MA, Hayward SA, Rinehart JP, Denlinger DL, Lee RE. 2008 Cryoprotective dehydration and the resistance to inoculative freezing in the Antarctic midge, *Belgica antarctica*. *J. Exp. Biol.* **211**, 524–530. (doi:10.1242/jeb.011874)
- Hackman W, LAKOVAARA S, Saura A, Sorsa M, Vepsäläinen K. 1970 On the biology and karyology of *Chymomyza costata* Zetterstedt, with reference to the taxonomy and distribution of various species of *Chymomyza* (Dipt., Drosophilidae). *Ann. Entomol. Fenn.* **36**, 1–9.
- Košťál V, Zahradníčková H, Šimek P. 2011 Hyperprolinemic larvae of the drosophilid fly, *Chymomyza costata*, survive cryopreservation in liquid nitrogen. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**, 13 041–13 046. (doi:10.1073/pnas.1107060108)
- Rozsypal J, Moos M, Šimek P, Košťál V. 2018 Thermal analysis of ice and glass transitions in insects that do and do not survive freezing. *J. Exp. Biol.* **221**, 170464. (doi:10.1242/jeb.170464)
- Des Marteaux LE, Hüla P, Košťál V. 2019 Transcriptional analysis of insect extreme freeze tolerance. *Proc. R. Soc. B* **286**, 20192019. (doi:10.1098/rspb.2019.2019)
- Grimaldi D. 1986 The *Chymomyza aldrichii* species-group (Diptera: Drosophilidae); relationships, new neotropical species, and the evolution of some sexual traits. *J. N. Y. Entomol. Soc.* **94**, 342–371.
- Markow TA, O'Grady PM. 2006 Phylogenetic relationships of Drosophilidae. In *Drosophila: A guide to species identification and use* (eds TA Markow, PM O'Grady), pp. 3–64. London, UK: Academic Press.
- Band H, Band R. 1982 Multiple overwintering mechanisms in *Chymomyza amoena* larvae (Diptera: Drosophilidae) and laboratory induction of freeze tolerance. *Experientia* **38**, 1448–1449. (doi:10.1007/BF01955762)
- Rinehart JP, Hayward SA, Elnitsky MA, Sandro LH, Lee RE, Denlinger DL. 2006 Continuous up-regulation of heat shock proteins in larvae, but not adults, of a polar insect. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**, 14 223–14 227. (doi:10.1073/pnas.0606840103)
- Hand SC, Menze MA, Toner M, Boswell L, Moore D. 2011 LEA proteins during water stress: not just for plants anymore. *Annu. Rev. Physiol.* **73**, 115–134. (doi:10.1146/annurev-physiol-012110-142203)
- Holmstrup M, Hedlund K, Boriss H. 2002 Drought acclimation and lipid composition in *Folsomia candida*: implications for cold shock, heat shock and acute desiccation stress. *J. Insect Physiol.* **48**, 961–970. (doi:10.1016/S0022-1910(02)00175-0)
- Lopez-Martinez G, Elnitsky MA, Benoit JB, Lee Jr RE, Denlinger DL. 2008 High resistance to oxidative damage in the Antarctic midge *Belgica antarctica*,

- and developmentally linked expression of genes encoding superoxide dismutase, catalase and heat shock proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **38**, 796–804. (doi:10.1016/j.ibmb.2008.05.006)
27. Philip BN, Yi S-X, Elnitsky MA, Lee RE. 2008 Aquaporins play a role in desiccation and freeze tolerance in larvae of the goldenrod gall fly, *Eurosta solidaginis*. *J. Exp. Biol.* **211**, 1114–1119. (doi:10.1242/jeb.016758)
  28. Ring R, Danks H. 1998 The role of trehalose in cold-hardiness and desiccation. *CryoLetters* **19**, 275–282.
  29. Benoit JB, Lopez-Martinez G, Michaud MR, Elnitsky MA, Lee Jr RE, Denlinger DL. 2007 Mechanisms to reduce dehydration stress in larvae of the Antarctic midge, *Belgica antarctica*. *J. Insect Physiol.* **53**, 656–667. (doi:10.1016/j.jinsphys.2007.04.006)
  30. Tapia H, Koshland DE. 2014 Trehalose is a versatile and long-lived chaperone for desiccation tolerance. *Curr. Biol.* **24**, 2758–2766. (doi:10.1016/j.cub.2014.10.005)
  31. Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM. 1992 Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* **54**, 579–599. (doi:10.1146/annurev.ph.54.030192.003051)
  32. Storey KB, Storey JM. 2013 Molecular biology of freezing tolerance. *Compr. Physiol.* **3**, 1283–1308. (doi:10.1002/cphy.c130007)
  33. Toxopeus J, Sindair BJ. 2018 Mechanisms underlying insect freeze tolerance. *Biol. Rev.* **93**, 1891–1914. (doi:10.1111/brv.12425)
  34. Thompson SN. 2003 Trehalose—the insect ‘blood’ sugar. *Adv. Insect Physiol.* **31**, 205–285. (doi:10.1016/S0065-2806(03)31004-5)
  35. Yancey PH. 2005 Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J. Exp. Biol.* **208**, 2819–2830. (doi:10.1242/jeb.01730)
  36. Crowe JH. 2007 Trehalose as a ‘chemical chaperone’. In *Molecular aspects of the stress response: chaperones, membranes and networks* (eds P Csermely, L Vigh), pp. 143–158. Berlin, Germany: Springer.
  37. Timasheff SN. 2002 Protein–solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 9721–9726. (doi:10.1073/pnas.122225399)
  38. Olgenblum GI, Sapir L, Harries D. 2020 Properties of aqueous trehalose mixtures: glass transition and hydrogen bonding. *J. Chem. Theory Comput.* **16**, 1249–1262. (doi:10.1021/acs.jctc.9b01071)
  39. Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN. 1982 Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**, 1214–1222. (doi:10.1126/science.7112124)
  40. Hochachka PW, Somero GN. 2002 *Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution*. Oxford, UK: Oxford University Press.
  41. Pullin AS. 1996 Physiological relationships between insect diapause and cold tolerance: coevolution or coincidence. *Eur. J. Entomol.* **93**, 121–130.
  42. Kučera L et al. 2022 A mixture of innate cryoprotectants is key for freeze tolerance and cryopreservation of a drosophilid fly larva. *J. Exp. Biol.* **225**, jeb243934. (doi:10.1242/jeb.243934)
  43. Riihimaa, Kimura. 1988.
  44. Kostal V, Noguchi H, Shimada K, Hayakawa Y. 1998 Developmental changes in dopamine levels in larvae of the fly *Chymomyza costata*: comparison between wild-type and mutant-nondiapause strains. *J. Insect Physiol.* **44**, 605–614. (doi:10.1016/S0022-1910(98)00043-2)
  45. Lakovaara S. 1969 Malt as a culture medium for *Drosophila* species. *Drosophila Inf. Serv.* **44**, 128.
  46. De Mercado E, Hernandez M, Sanz E, Rodriguez A, Gomez E, Vazquez J, Martinez E, Roca J. 2009 Evaluation of L-glutamine for cryopreservation of boar spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* **115**, 149–157. (doi:10.1016/j.anireprosci.2008.11.014)
  47. Košťál V, Štětina T, Poupardin R, Korbellová J, Bruce AW. 2017 Conceptual framework of the eco-physiological phases of insect diapause development justified by transcriptomic profiling. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **114**, 8532–8537. (doi:10.1073/pnas.1707281114)
  48. Moos M, Korbellová J, Štětina T, Opekár S, Šimek P, Grgac R, Košťál V. 2022 Cryoprotective metabolites are sourced from both external diet and internal macromolecular reserves during metabolic reprogramming for freeze tolerance in drosophilid fly, *Chymomyza costata*. *Metabolites* **12**, 163. (doi:10.3390/metabol12020163)
  49. ter Braak CJ, Šmilauer P. 2012 *Canoco reference manual and user's guide: software for ordination (version 5.0)*. Ithaca, NY: Microcomputer Power.
  50. Benoit JB, Lopez-Martinez G, Elnitsky MA, Lee Jr RE, Denlinger DL. 2009 Dehydration-induced cross tolerance of *Belgica antarctica* larvae to cold and heat is facilitated by trehalose accumulation. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* **152**, 518–523. (doi:10.1016/j.cbpa.2008.12.009)
  51. Košťál V, Korbellová J, Poupardin R, Moos M, Šimek P. 2016 Arginine and proline applied as food additives stimulate high freeze tolerance in larvae of *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* **219**, 2358–2367. (doi:10.1242/jeb.142158)
  52. Košťál V, Šimek P, Zahradnicková H, Cimlová J, Štětina T. 2012 Conversion of the chill susceptible fruit fly larva (*Drosophila melanogaster*) to a freeze tolerant organism. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 3270–3274. (doi:10.1073/pnas.1119986109)
  53. Li Y, Zhang L, Chen H, Košťál V, Šimek P, Moos M, Denlinger DL. 2015 Shifts in metabolomic profiles of the parasitoid *Nasonia vitripennis* associated with elevated cold tolerance induced by the parasitoid's diapause, host diapause and host diet augmented with proline. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **63**, 34–46. (doi:10.1016/j.ibmb.2015.05.012)
  54. Zhang L et al. 2016 L-proline: a highly effective cryoprotectant for mouse oocyte vitrification. *Sci. Rep.* **6**, 1–8. (doi:10.1038/s41598-016-0001-8)
  55. Dou M, Li Y, Sun Z, Li L, Rao W. 2019 L-proline feeding for augmented freeze tolerance of *Camponotus japonicus* Mayr. *Sci. Bull.* **64**, 1795–1804. (doi:10.1016/j.scib.2019.09.028)
  56. Tuncer PB, Sanözkan S, Bucak MN, Ulutaş PA, Akalın PP, Büyükleblebig S, Canturk F. 2011 Effect of glutamine and sugars after bull spermatozoa cryopreservation. *Theriogenology* **75**, 1459–1465. (doi:10.1016/j.theriogenology.2010.12.006)
  57. Toxopeus J, Košťál V, Sindair BJ. 2019 Evidence for non-colligative function of small cryoprotectants in a freeze-tolerant insect. *Proc. R. Soc. B* **286**, 20190050. (doi:10.1098/rspb.2019.0050)
  58. Gertrudes A, Craveiro R, Eltayari Z, Reis RL, Paiva A, Duarte ARC. 2017 How do animals survive extreme temperature amplitudes? The role of natural deep eutectic solvents. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **5**, 9542–9553. (doi:10.1021/acsuschemeng.7b01707)
  59. Xin Z, Browse J. 2000 Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant Cell Environ.* **23**, 893–902. (doi:10.1046/j.1365-3040.2000.00611.x)
  60. Arakawa T, Timasheff S. 1985 The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys. J.* **47**, 411–414. (doi:10.1016/S0006-3495(85)83932-1)
  61. Rasmussen PH, Jørgensen B, Nielsen J. 1997 Aqueous solutions of proline and NaCl studied by differential scanning calorimetry at subzero temperatures. *Thermochim. Acta* **303**, 23–30. (doi:10.1016/S0040-6031(97)00241-4)
  62. Crowe JH, Carpenter JF, Crowe LM. 1998 The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* **60**, 73–103. (doi:10.1146/annurev.physiol.60.1.73)
  63. McLain SE, Soper AK, Terry AE, Watts A. 2007 Structure and hydration of L-proline in aqueous solutions. *J. Phys. Chem. B* **111**, 4568–4580. (doi:10.1021/jp068340f)
  64. Troitzsch R, Vass H, Hossack W, Martyna G, Crain J. 2008 Molecular mechanisms of cryoprotection in aqueous proline: light scattering and molecular dynamics simulations. *J. Phys. Chem. B* **112**, 4290–4297. (doi:10.1021/jp076713m)
  65. de Molina PM, Alvarez F, Frick B, Wildes A, Arbe A, Colmenero J. 2017 Investigation of the dynamics of aqueous proline solutions using neutron scattering and molecular dynamics simulations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **19**, 27 739–27 754. (doi:10.1039/C7CP05474B)
  66. Choi YH, van Spronsen J, Dai Y, Verberne M, Hollmann F, Arends IW, Witkamp G-J, Verpoorte R. 2011 Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant Physiol.* **156**, 1701–1705. (doi:10.1104/pp.111.178426)
  67. Amidi F, Pazhohan A, Nashtaei MS, Khodarahmian M, Nekoonam S. 2016 The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell Tissue Bank.* **17**, 745–756. (doi:10.1007/s10561-016-9566-5)
  68. Wilsteman K, Ballinger MA, Williams CM. 2021 A unifying, eco-physiological framework for animal dormancy. *Funct. Ecol.* **35**, 11–31. (doi:10.1111/1365-2435.13718)
  69. Yancey PH, Siebenaller JF. 2015 Co-evolution of proteins and solutions: protein adaptation versus cytoprotective micromolecules and their roles in marine organisms. *J. Exp. Biol.* **218**, 1880–1896. (doi:10.1242/jeb.114355)
  70. Hula P, Moos M, Marteau LD, Šimek P, Košťál V. 2022 Insect cross-tolerance to freezing and drought stress: role of metabolic rearrangement. FigShare. (doi:10.6084/m9.figshare.c.6006457)

## RESEARCH ARTICLE

# A mixture of innate cryoprotectants is key for freeze tolerance and cryopreservation of a drosophilid fly larva

Lukáš Kučera<sup>1,†</sup>, Martin Moos<sup>2,†</sup>, Tomáš Štětina<sup>2</sup>, Jaroslava Korbelová<sup>2</sup>, Petr Vodrážka<sup>2</sup>, Lauren Des Marteaux<sup>2,\*</sup>, Robert Grgac<sup>2,3</sup>, Petr Hůla<sup>2,3</sup>, Jan Rozsypal<sup>2</sup>, Miloš Faltus<sup>4</sup>, Petr Šimek<sup>2</sup>, Radislav Sedlacek<sup>1</sup> and Vladimír Košťál<sup>2,§</sup>

## ABSTRACT

Insects that naturally tolerate internal freezing produce complex mixtures of multiple cryoprotectants (CPs). Better knowledge on composition of these mixtures, and on the mechanisms of individual CP interactions, could inspire development of laboratory CP formulations optimized for cryopreservation of cells and other biological material. Here, we identify and quantify (using high resolution mass spectrometry) a range of putative CPs in larval tissues of a subarctic fly, *Chymomyza costata*, which survives long-term cryopreservation in liquid nitrogen. The CPs proline, trehalose, glutamine, asparagine, glycine betaine, glycerophosphoethanolamine, glycerophosphocholine and sarcosine accumulate in hemolymph in a ratio of 313:108.55:26.6:4:2.9:0.5 mmol l<sup>-1</sup>. Using calorimetry, we show that artificial mixtures, mimicking the concentrations of major CPs in hemolymph of freeze-tolerant larvae, suppress the melting point of water and significantly reduce the ice fraction. We demonstrate in a bioassay that mixtures of CPs administered through the diet act synergistically rather than additively to enable cryopreservation of otherwise freeze-sensitive larvae. Using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging (MALDI-MSI), we show that during slow extracellular freezing trehalose becomes concentrated in partially dehydrated hemolymph where it stimulates transition to the amorphous glass phase. In contrast, proline moves to the boundary between extracellular ice and dehydrated hemolymph and tissues where it probably forms a layer of dense viscoelastic liquid. We propose that amorphous glass and viscoelastic liquids may protect macromolecules and cells from thermomechanical shocks associated with freezing and transfer into and out of liquid nitrogen.

**KEY WORDS:** Freeze tolerance, Cryoprotection, Insects, Metabolites, Natural deep eutectic systems

## INTRODUCTION

Various organisms from bacteria to animals respond to environmental stressors such as heat, cold, freezing, drought, hypersalinity and high hydrostatic pressure by accumulating a stereotypic set of cytoprotective compounds including amino acids, sugars, polyols and methylamines (Somero, 1986; Yancey, 2005). This is also true for insects that naturally tolerate extracellular freezing during overwintering in temperate and polar habitats (Lee, 2010; Storey and Storey, 1988). In such insects, the accumulation of low molecular weight carbohydrate and free amino acid cryoprotectants (CPs) is considered a fundamental tenet of their freeze tolerance (Storey, 1997; Storey and Storey, 1988; Storey and Storey, 1991; Toxopeus and Sinclair, 2018). Extensive knowledge has accumulated over many decades about which CPs are present in many different species (Asahina, 1970; Salt, 1961; Sømme, 1982; Storey and Storey, 1991), but our understanding of how they protect the insect tissues and cells is far from complete (Toxopeus and Sinclair, 2018).

Here, we focus on an important but previously neglected aspect of natural freeze tolerance: the components of complex mixtures of multiple CPs may contribute to freeze tolerance via additive or even synergistic mechanisms (Storey and Storey, 1986; Storey and Storey, 1988; Toxopeus et al., 2019). It is well known from practice in clinical medicine and biotechnology that combinations of CPs protect the viability of cryopreserved cells or materials better than single substances (Elliott et al., 2017). The mixtures may even have emergent properties, i.e. those beyond the summation of properties of the individual components. Relatively recently, the existence of specific mixtures, so-called NADES (natural deep eutectic systems) in various organisms was proposed (Dai et al., 2013; Choi et al., 2011). These mixtures consist of stereotypic sets of natural primary metabolites such as sugars, sugar alcohols, organic acids, amino acids and amines, and are characterized by a much lower melting point than that of the individual components, mainly because of the formation of intermolecular hydrogen bonds (Dai et al., 2015). These mixtures have been proposed to serve various physiological functions, including survival of organisms in extreme drought and cold (Castro et al., 2018; Gertrudes et al., 2017; Liu et al., 2018), and have also been proposed as new agents for cell cryopreservation (Hombberger et al., 2021). We believe that there may be major practical consequences of exploring the complex composition of insect CP mixtures, as they could aid in the development of applicable cryogenic techniques. Freeze-tolerant insects also offer the potential for the discovery of novel components, for the study of interactions between individual components, and for the analysis of the principles underlying survival after freezing in a complex organism composed of different cell types and tissues; a complexity that still poses a challenge for medical cryopreservation (Fahy et al., 2006; Pegg, 2001).

<sup>1</sup>Czech Centre of Phenogenomics, Institute of Molecular Genetics, Czech Academy of Sciences, 25250 Vestec, Czech Republic. <sup>2</sup>Institute of Entomology, Biology Centre, Czech Academy of Sciences, 37005 České Budějovice, Czech Republic. <sup>3</sup>Faculty of Science, University of South Bohemia, 37005 České Budějovice, Czech Republic. <sup>4</sup>Crop Research Institute, 16106 Praha, Czech Republic.

\*Present address: Agriculture and Agri-Food Canada, Harrow Research and Development Centre, Harrow, ON, Canada, N0R 1G0.

†These authors contributed equally to this work.

§Author for correspondence (kostal@entu.cas.cz)

© L.K., 0000-0002-0009-5105; M.M., 0000-0003-3930-3132; T.Štětina, 0000-0001-7289-5534; P.V., 0000-0001-9875-668X; L.D., 0000-0002-0461-2704; P.H., 0000-0002-5797-010X; J.R., 0000-0002-7925-7401; M.F., 0000-0003-2217-5226; P.Šimek, 0000-0003-2754-6372; R.S., 0000-0002-3352-392X; V.K., 0000-0002-4994-5123

Received 14 January 2022; Accepted 29 March 2022

It is reasonable to first analyze the suite of CPs accumulated by the most freeze-tolerant model species, and larvae of the malt fly, *Chymomyza costata* (Diptera: Drosophilidae), are among the most cold-hardy animals known (Des Marteaux et al., 2019). Overwintering cold-acclimated larvae in diapause can survive freezing of all osmotically active water (68% of total body water), down to  $-75^{\circ}\text{C}$ , with survival rates similar to those in unfrozen controls, and they can even survive long-term (18 month) cryopreservation in liquid  $\text{N}_2$  (Moon et al., 1996; Rozsypal et al., 2018; Shimada and Riihimaa, 1988). We have previously shown that high concentrations of the free amino acid proline acquired by diapausing *C. costata* larvae during cold acclimation are essential for the survival of freezing and cryopreservation stress (Košťál et al., 2011b; Rozsypal et al., 2018).

Here, we extend our previous results to include a whole complex of CPs accumulated by these freeze-tolerant larvae. Using a combination of four chromatographic mass spectrometric (MS) analytical platforms, we established metabolite profiles of four different *C. costata* tissues in two contrasting larval phenotypes that differ greatly in freeze tolerance and cryopreservability in liquid  $\text{N}_2$ . By combining the results of the analytical chromatographic MS analysis with matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry imaging (MSI), we show that freeze-tolerant larvae accumulate putative CPs in all tissues, but especially in hemolymph. Using the same technique, we observed changes in CP localization during slow extracellular freezing associated with partial dehydration of hemolymph and tissues. We then used differential scanning calorimetry (DSC) to determine the thermal phase transition properties of artificial aqueous CP mixtures mimicking the concentrations of the five most abundant metabolites in the hemolymph. Finally, we show in a bioassay that mixtures of CPs administered through the diet work in a synergistic rather than an additive way to induce strong freeze tolerance and cryopreservability in otherwise freeze-sensitive larvae.

## MATERIALS AND METHODS

### Fly rearing and acclimations

A colony of *C. costata*, Sapporo strain (Riihimaa and Kimura, 1988), was reared on artificial diet in MIR 154 incubators (Sanyo Electric, Osaka, Japan) as described previously (Kostal et al., 1998; Lakovaara, 1969). Two phenotypic variants (LD and SDA) of the 3rd larval instar were generated according to our earlier acclimation protocols (Des Marteaux et al., 2019; Košťál et al., 2011b; Rozsypal et al., 2018) (Fig. S1a). The LD larvae (warm acclimated, active larvae reared at long-day conditions) have limited survival after freezing (35% survive to  $-5^{\circ}\text{C}$ , 10% to  $-10^{\circ}\text{C}$ , and none survive freezing to  $-20^{\circ}\text{C}$  or below). In contrast, practically all SDA larvae (diapause larvae reared at short-day conditions and gradually acclimated to cold) survive deep freezing to  $-30^{\circ}\text{C}$  or even  $-75^{\circ}\text{C}$ , and 42.5% survive at least 18 months of cryopreservation in liquid  $\text{N}_2$  (Rozsypal et al., 2018). In addition, SDA larvae were frozen (variant SDA-frozen) according to a previously developed optimal freezing protocol (Rozsypal et al., 2018) schematically presented in Fig. S1b. Survival after freezing and cryopreservation in liquid  $\text{N}_2$  was assessed as the ability to pupate and metamorphose into the adult stage within 42 days of thawing (at a constant  $18^{\circ}\text{C}$ , LD).

To collect the hemolymph, 30 larvae were gently pierced and torn on a piece of Parafilm, creating a large droplet of pooled hemolymph. This droplet was then extracted using a calibrated glass capillary (Drummond Sci., Broomall, PA, USA). Collection of hemolymph in a single group of 30 larvae took less than 2 min. To obtain fat body, muscle and midgut tissues, the larvae were

quickly dissected under binocular microscope in ice-cold phosphate-buffered saline. Dissected tissues were collected in ice-cold extraction buffer (see below) and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. Dissection of a single larva took less than 2 min, and we took care to sample a similar part of the respective tissue from each individual. This allowed us to express each metabolite concentration as a 'pool per tissue'. Only in hemolymph samples where we could measure the exact sample volume, could we also calculate the concentration in  $\text{mmol l}^{-1}$ .

### Extraction of metabolites and analytical MS platforms

Analyses were performed for whole *C. costata* larvae (pools of five larvae taken in four replicates) or dissected tissues (pools of 30 tissues in four replicates). Whole larvae were weighed to obtain fresh mass, immersed in liquid  $\text{N}_2$ , and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. Frozen samples of whole larvae/tissues were melted on ice and homogenized in 400  $\mu\text{l}$  of extraction buffer (methanol:acetonitrile:deionized water in a volume ratio of 2:2:1). The methanol and acetonitrile (Optima LC/MS) were purchased from Fisher Scientific (Pardubice, Czech Republic) and the deionized water was prepared using Direct Q 3UV (Merck, Prague, Czech Republic). Internal standards, *p*-fluoro-DL-phenylalanine, methyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside (both from Sigma-Aldrich, St Louis, MI, USA) were added to the extraction buffer, both at a final concentration of 200  $\text{nmol ml}^{-1}$ . Samples were homogenized using a TissueLyser LT (Qiagen, Hilden, Germany) set to 50 Hz for 5 min (with a rotor pre-chilled to  $-20^{\circ}\text{C}$ ). Homogenization and centrifugation (at 20,000 *g* for 5 min at  $4^{\circ}\text{C}$ ) were repeated twice and the two supernatants were combined.

We performed targeted analyses of 49 select metabolites (Table S1) using a combination of four different mass spectrometry-based (MS) analytical platforms that were described previously: ECF-LC/MS and ECF-GC/MS (Štětina et al., 2018), SILYL-GC/MS (Škodová-Sveráková et al., 2020) and HILIC-LC/MS (Škodová-Sveráková et al., 2021). More details on instrumentation and chromatographic columns are in Table S1. All 49 metabolites were identified against relevant standards (Sigma-Aldrich) and subjected to quantitative analysis using a standard calibration curve method. The analytical results were validated by simultaneously running blank samples (no larvae in the sample), standard biological quality control samples (the periodic analysis of a standardized larva/tissue sample – the pool of all samples) and quality control mixtures of amino acids (AAS18, Sigma-Aldrich).

### Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging (MALDI-MSI)

The MALDI-MSI (Khalil et al., 2017; Tuthill et al., 2020; Yang et al., 2020) was conducted in LD and SDA larvae and also on SDA frozen larvae (Fig. S1); the LD frozen variant was not considered relevant as all LD larvae die when exposed to freezing to  $-30^{\circ}\text{C}$ . Larvae were rinsed in water, incubated for 3 min in 2% gelatin, and then submerged into 5 ml of 10% gelatin in a plastic mold (Tissue-Tek Cryomold, Sakura, Mdesa, Czech Republic) placed on an ice-cold stage. The molds with solid gelatin were then immersed in isopentane pre-cooled to  $-140^{\circ}\text{C}$  in liquid  $\text{N}_2$  vapors for 3 min and transferred to  $-80^{\circ}\text{C}$  for storage until further processing. Preparation of the SDA frozen larvae was modified as shown in Fig. S2.

For cryo-sectioning, the frozen molds were placed into a cryostat chamber (Leica CM1950, Germany) pre-cooled to  $-20^{\circ}\text{C}$ . Sections of 10  $\mu\text{m}$  thickness were mounted on indium tin oxide coated glass slides (ITO, Bruker, Czech Republic), previously washed with hexane and then with 2-propanol. Sections of the LD and SDA

larval variants were thaw-mounted on warm glass (standard procedure MALDI-TOF/MSI) (TOF, time of flight), while sections of the SDA frozen larval variant were mounted on a gold-coated ITO glass pre-cooled to  $-20^{\circ}\text{C}$  in order to preserve the tissue organization as it formed during slow pre-freezing (extracellular ice formation and tissue freeze-dehydration). The sections were dried for 15 min in a desiccator at low air pressure (at room temperature for the LD and SDA variants, while at  $-20^{\circ}\text{C}$  for the SDA frozen variant), then sealed in plastic foil inside a plastic mailer, evacuated, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further processing. The ITO glasses with sections were transferred to room temperature, left to temper for 15 min, and dried in a desiccator for 15 min. Samples were then sprayed with a matrix solution of 9-aminoacridine hydrochloride,  $7\text{ mg ml}^{-1}$  in 70% ethanol (v/v). A TM-Sprayer 3 (HTX-Technologies, USA) was used to cover the tissue with the matrix solution using the following settings: nozzle temperature,  $50^{\circ}\text{C}$ ; 12 passes; flow,  $0.035\text{ ml min}^{-1}$ ; nozzle velocity,  $1000\text{ mm min}^{-1}$ ; track spacing, 2 mm, HH pattern; gas pressure, 10 psi; gas flow rate,  $2\text{ l min}^{-1}$ ; drying time, 0 s; nozzle height, 40 mm; and propelled with 50% methanol (v/v). After spraying, the samples were dried in a desiccator for 15 min.

Spectral images were acquired using a rapifleX MALDI-TOF/TOF spectrometer (Bruker, Germany) in reflector negative mode with a 355 nm smartbeam™ 3D laser with a spatial resolution of  $10\times 10\text{ }\mu\text{m}$  (pixel) in an m/z range of 20–1000, at a constant laser fluence of 72% and laser frequency of 5 kHz. Two hundred images were accumulated from every position. The instruments were set up with: ion source 1, 19.973 kV; PIE, 2.664 kV; lens, 11.353 kV; reflector 1, 20.810 kV; reflector 2, 1.034 kV; reflector 3, 8.577 kV. The pulsed ion extraction time was set to 90 ns and detector gain was 2302 V. Data were acquired with digitizer speed,  $2.5\text{ GS s}^{-1}$ . Samples were measured in random order. Calibration was done externally using red phosphorus, achieving precision up to 5 p.p.m. (Kolářová et al., 2016).

After MALDI-MSI, tissues on ITO glass were washed three times for 2 min with 70% ethanol and afterwards washed with water. The samples were then stained with Hematoxylin and Eosin (H&E, a general staining method, which allows to visualize the shape, and structure of cells in a tissue sample; Hematoxylin stains mainly heterochromatin and nucleoli, while Eosin stains cytoplasmic components including collagen and elastic fibers) and scanned with Axio Scan.Z1 (Zeiss, Germany) operated by Zen 2 software (blue edition; Zeiss, Germany). Single raw data files on the intensities of the MALDI-TOF signals of individual m/z peaks were processed using SCiLS Lab software (v.2021c, SCiLS, Bruker, Germany). The raw data were smoothed with a convolution algorithm (width 20) and all subsequent computations and images rendering were done with total ion count square normalization. We collected MALDI-TOF signal-intensity datasets for 5 transverse sections of LD and SDA larvae and for 6 sections of SDA frozen larvae, plus one longitudinal section of an SDA larva. For relative quantification of signal intensities and statistical analyses, the transversal sections were used. Galleries showing the complete results for all transversal sections are available in figshare ([https://figshare.com/articles/figure/Appendix\\_MALDI\\_MSI\\_images\\_pdf/19590694](https://figshare.com/articles/figure/Appendix_MALDI_MSI_images_pdf/19590694)).

Regions (or tissues) of interest in the sections were manually delimited using H&E-stained images in QuPath software (v.0.2.3, University of Edinburgh, UK) (Bankhead et al., 2017) and imported into SCiLS software. The summary spectrum was exported into mMass software (v.5.5.0) (Niedermeyer and Strohal, 2012), internally re-calibrated, and annotated based on m/z values with 50 ppm tolerance using an in-house modified database based on the

HMDB metabolite database considering  $[\text{M}-\text{H}]^{-}$  and  $[\text{M}+\text{Cl}]^{-}$  adducts (Wishart et al., 2018). Selected peaks were then analyzed using SCiLS software with mean spectral intensity scaled in arbitrary units (A.U.) for each region and treatment. These spectral intensity data were then statistically compared using ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test (Prism, v.6.07, GraphPad Software, San Diego, USA). In addition, we verified the identities of m/z peaks for trehalose and proline in the experiment where LD larvae were fed diet augmented with  $^{13}\text{C}_6$  glucose (for details, see Figs S13 and S14). The  $^{13}\text{C}_6$  glucose was purchased from Sigma-Aldrich (product ID 389374).

#### Differential scanning calorimetry (DSC)

Thermal analysis was performed using the Q2000 calorimeter (TA Instruments, New Castle, DE, USA) as previously described (Pokorna et al., 2020). The analyzed solutions (see Table S2 for a complete list) were loaded and hermetically sealed into aluminium pans. The amount of loaded solution ( $\sim 5\text{ }\mu\text{l}$ ) was controlled by weighing with precision to 0.01 mg using a Sartorius CP 225 D balance (Sartorius AG, Goettingen, Germany). The solutions were frozen and thawed according to the following protocol: (i) start at  $25^{\circ}\text{C}$ , (ii) cool to  $-90^{\circ}\text{C}$  at  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , (iii) hold for 5 min at  $-90^{\circ}\text{C}$ , and (iv) warm to  $25^{\circ}\text{C}$  at  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . An empty pan was used as a reference, and samples were run in technical triplicates (same solution analyzed three times). DSC results were analyzed using TA Universal Analysis 2000 software (v.4.5A Build 4.5.0.5). The onset of exotherm on the cooling scan was taken as the supercooling point (temperature of ice crystallization). Two major thermal events were analyzed on heating scans above  $-60^{\circ}\text{C}$ . (1) Glass transition: an inflection point of the second-order phase transition was read as the temperature of vitrification ( $T_g$ ). The change in specific heat capacity ( $\Delta C_p$ ) was derived from the difference in heat flow between the onset and the end of the glass transition. (2) Melting of bulk water: an onset of melting endotherm (first-order phase transition) was read as the melting point (m.p.), while the enthalpy of melting ( $\Delta H$ , calculated from the area under the endothermic peak) served to estimate the fraction of melted (i.e. crystallized) water using the standard heat of fusion for the ice/water transition of  $334\text{ J g}^{-1}$ . The remaining fraction of unfrozen water was considered osmotically inactive (%OIW).

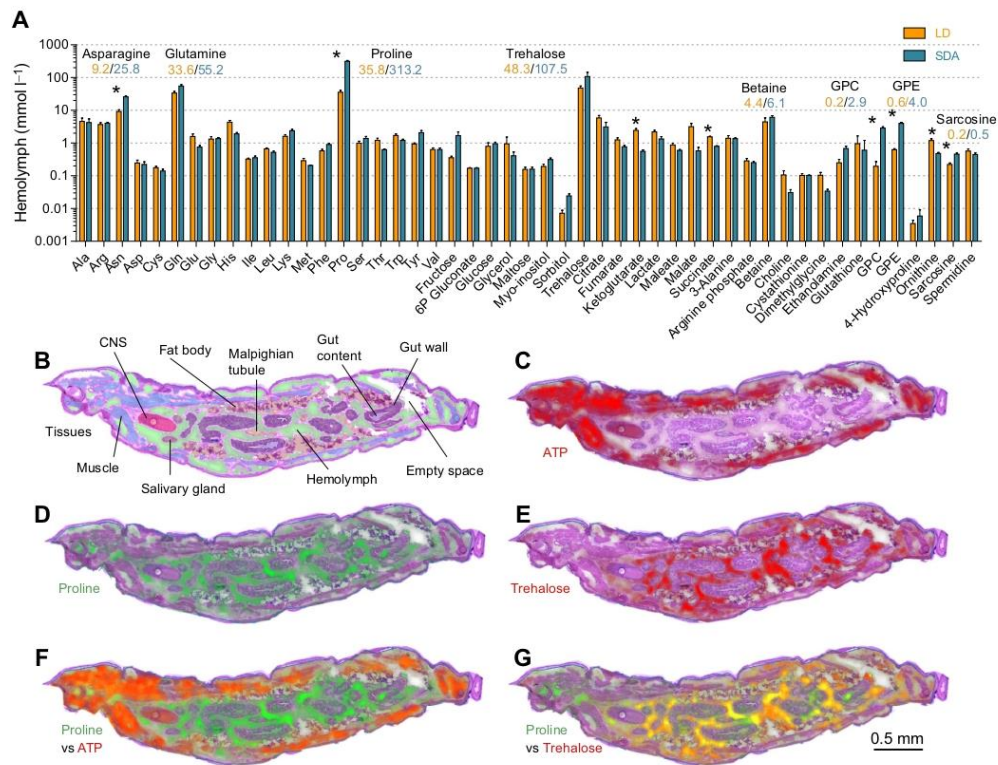
#### Larval feeding on CP-augmented diets

Seventeen-day-old freeze sensitive (LD) larvae (i.e. roughly mid-3rd instar, voracious feeding stage) were extracted from the standard diet and groups of 20 individuals were moved to one of a variety of specific diets: (i) fresh standard diet (control); (ii) 'CP mix 508' diet – a standard diet augmented with five select CPs (proline, product ID P0380; trehalose, T9449; glutamine, G3126; asparagine, A0884; and betaine, 61962; all from Sigma-Aldrich) in concentrations corresponding to those observed in SDA larval hemolymph (i.e.  $508\text{ mmol kg}^{-1}$  water in total, see Table S3); (iii) five different standard diets augmented with the select CPs individually; (iv) 'CP mix minus Pro 313' diet – a mixture of the four select CPs but without the  $313\text{ mmol kg}^{-1}$  proline [because proline was the only metabolite capable of supporting freeze tolerance in a previous experiment (iii)]. After exposure to these diets for 3 days, the larvae were removed and used for the liquid  $\text{N}_2$  survival bioassay (Fig. S1b).

## RESULTS

#### Characterization of the CP mixture from *C. costata* larvae

Results of targeted quantitative analysis of 49 metabolites are summarized in Table S1 and plotted in Fig. 1A (hemolymph) and



**Fig. 1. Metabolite profiles and localization in hemolymph and tissues of *Chymomyza costata* larvae.** (A) Forty-nine target metabolites were absolutely quantified in the hemolymph of freeze-sensitive (LD) and freeze-tolerant (SDA) larvae using four MS-based analytical platforms. Each column represents a metabolite concentration (means  $\pm$  s.d.;  $n=4$  biological replicates, each containing hemolymph from 30 larvae). Differences between the means of LD and SDA were assessed by unpaired  $t$ -tests corrected for multiple comparisons using the Holm–Sidak method with  $\alpha=0.01$ . Asterisks indicate significantly different means and the concentrations are shown for all metabolites that were considered in this paper as putative CPs (GPC, glycerophosphocholine; GPE, glycerophosphoethanolamine). (B) Longitudinal section of a SDA larva stained with Hematoxylin and Eosin, with tissues highlighted by different colors. (C–E) Intensities of the MALDI-TOF signals corresponding to the three analyzed compounds: ATP (C); proline (D); trehalose (E). (F) While proline (green signal) is most evident in hemolymph, ATP (red signal) is mainly found in muscles. (G) Proline (green) and trehalose (red) colocalize in hemolymph (a yellow color results from the mixing of green and red). See Fig. S3 for MALDI-MSI images of other compounds.

Fig. S3 (other tissues). For most metabolites, the pool in the hemolymph was significantly larger than the pools in other tissues (Fig. S4). The volume of hemolymph in one larva is approximately 200 nl (see Table S1) representing only 10% of the total body volume or body mass ( $\sim 2$  mg). Nevertheless, the hemolymph contained approximately 50% of the total metabolite pool in both LD and SDA larvae (Table S1). Entry into diapause and cold acclimation (associated with the acquisition of extreme freeze tolerance) induced accumulation of specific metabolites (putative CPs) in SDA larvae (Fig. S1). The sum of the molar concentrations of the 49 metabolites in LD hemolymph was  $182 \text{ mmol l}^{-1}$ , but this increased to  $554 \text{ mmol l}^{-1}$  in SDA hemolymph (Table S1). Four compounds that contributed most to this increase were: proline (increase of  $277 \text{ mmol l}^{-1}$ ), trehalose (increase of  $59 \text{ mmol l}^{-1}$ ), glutamine (increase of  $22 \text{ mmol l}^{-1}$ ) and asparagine (increase of  $17 \text{ mmol l}^{-1}$ ). The same four compounds also ranked first in order of concentration in SDA hemolymph: proline ( $313 \text{ mmol l}^{-1}$ ),

trehalose ( $108 \text{ mmol l}^{-1}$ ), glutamine ( $55 \text{ mmol l}^{-1}$ ) and asparagine ( $26 \text{ mmol l}^{-1}$ ). Glycine-betaine (hereafter ‘betaine’,  $6.1 \text{ mmol l}^{-1}$ ) was fifth in concentration, although it increased only moderately (by  $1.7 \text{ mmol l}^{-1}$ ) in SDA compared with LD larvae. In addition, three other compounds had statistically higher hemolymph concentrations in SDA than in LD larvae, although their concentrations in SDA hemolymph were relatively low in absolute terms: glycerophosphoethanolamine (GPE,  $4.0 \text{ mmol l}^{-1}$ ), glycerophosphocholine (GPC,  $2.9 \text{ mmol l}^{-1}$ ) and sarcosine ( $0.5 \text{ mmol l}^{-1}$ ). For the purposes of this article, we consider the above compounds as putative CPs.

#### Localization of CP mixture components in larval tissues

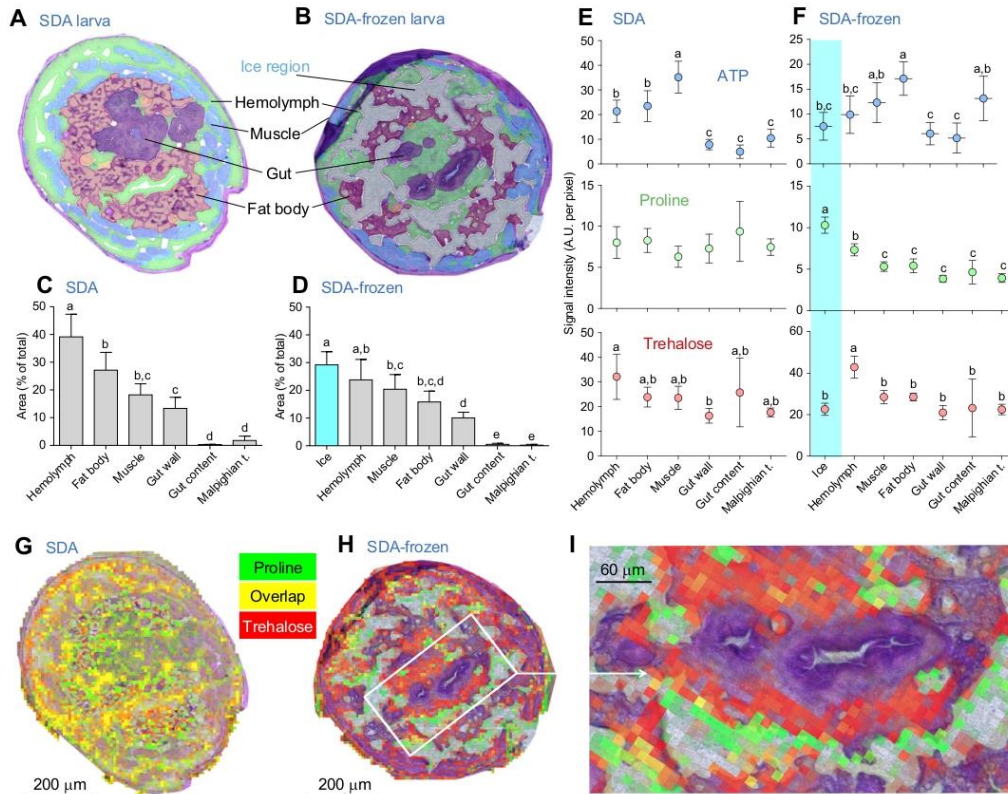
Using MALDI-MSI, we localized select metabolites in larval sections. A longitudinal section through the SDA larva provides the best overview of tissue structure (Fig. 1B). The highest intensity of the MALDI-TOF signal for ATP is localized predominantly in

muscle tissue (corresponding to its role as the most important intracellular phosphagen) (Fig. 1C). In contrast, the highest intensities of proline and trehalose signals are localized in the hemolymph (Fig. 1D,E), where they are also colocalized with the high-intensity signals of glutamine, asparagine and GPE (Fig. S5).

As it was difficult to obtain enough high-quality longitudinal sections, we used transverse sections through the middle region of the larvae for the statistical analysis of the relative intensities of the MALDI-TOF signals. Quantitative analysis of these signals is technically difficult for small metabolite molecules freely dissolved in biological aqueous solutions (Fig. S6). Nevertheless, our analysis suggests that there are no differences in the overall localization patterns of the five putative CPs (proline, trehalose, glutamine, asparagine and GPE) between LD and SDA larvae. However, the

signal intensities for all five CPs were much stronger in SDA than in LD larvae (compare the y-axes of Fig. S7 with Fig. S8). The MALDI-MSI thus confirms the results of the quantitative MS analysis (Fig. 1A) that the putative CPs are accumulated in all tissues, but especially in the hemolymph, of SDA larvae (for details, see MALDI-MSI images in figshare ([https://figshare.com/articles/figure/Appendix\\_MALDI\\_MSI\\_images\\_pdf/19590694](https://figshare.com/articles/figure/Appendix_MALDI_MSI_images_pdf/19590694))).

During slow inoculative freezing to  $-30^{\circ}\text{C}$  (rate of  $0.1^{\circ}\text{C min}^{-1}$  see Fig. S1b for the freezing protocol) large masses of extracellular ice crystals developed in between partially dehydrated pools of larval hemolymph and tissues (Fig. 2A–D). We observed a striking difference in the ‘behavior’ of two major components of the CP mixture during slow extracellular freezing: whereas trehalose was concentrated in the pool of dehydrated hemolymph of SDA larvae, a



**Fig. 2. Localization of proline and trehalose in *C. costata* SDA larvae before and after slow freezing.** (A,B) Examples of transverse sections through the middle region of SDA larva (A) and SDA-frozen larva (B). The tissues are highlighted in different colors. Note the large masses of extracellular ice between the partially dehydrated tissues of SDA-frozen larva. (C,D) Relative proportions of total area occupied by different tissues or ice. Each column is mean  $\pm$  s.d. of five or six sections (SDA or SDA-frozen larvae, respectively). Means flanked by different letters are significantly different (one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test). (E,F) Results of MALDI-TOF signal intensity quantification (arbitrary units, A.U. per pixel of  $10 \times 10 \mu\text{m}$ ) for three select metabolites (ATP, proline, trehalose). Each point is the mean  $\pm$  s.d. of five or six sections (SDA or SDA-frozen larvae, respectively). Mean values flanked by different letters are significantly different (one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test). (G,H,I) Examples of MALDI-TOF signal intensities for proline (green) and trehalose (red). Note that proline and trehalose signals markedly overlap (yellow color) in the hemolymph of SDA larva (G), while they apparently delocalize in SDA-frozen larva (H,I). Trehalose concentrates in the partially dehydrated hemolymph, while proline migrates to the border between extracellular ice and partially dehydrated tissues of the SDA-frozen larva.

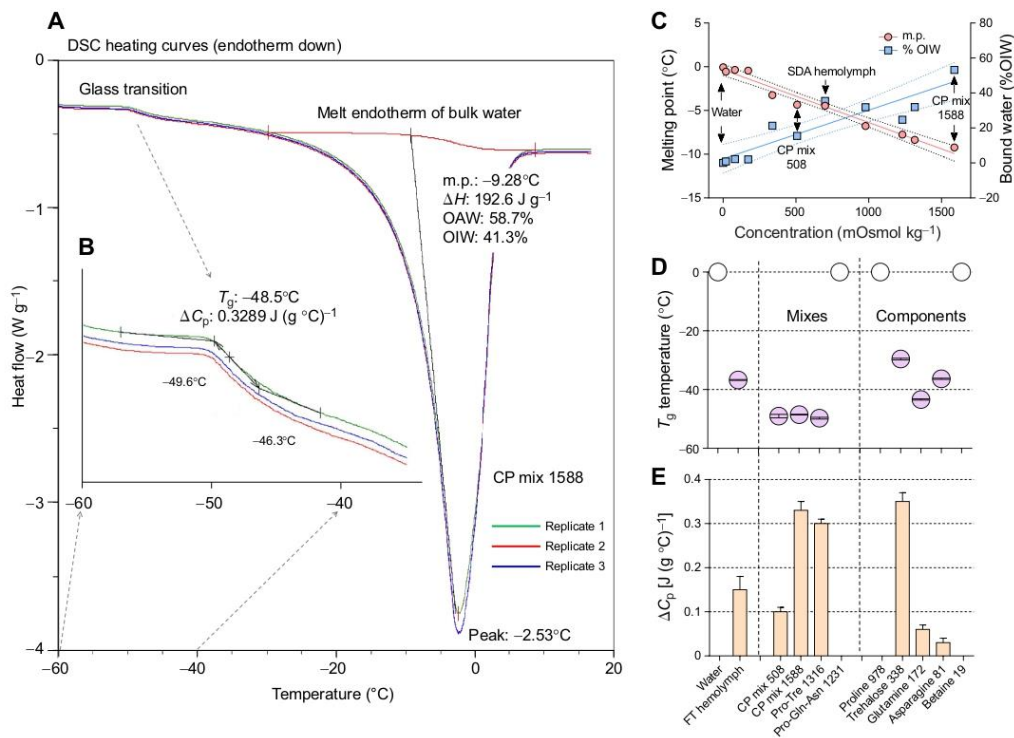
large quantity of proline apparently ‘migrated’ from the hemolymph toward the ice region (Fig. 2E,F) and formed thin ‘layers’ of concentrated proline at the boundary between the extracellular ice and the dehydrated hemolymph and tissues (Fig. 2G–I). In these layers, proline colocalized with high-intensity signals from glutamine and asparagine, while trehalose colocalized with GPE in the dehydrated hemolymph (Fig. S9; for details, see figshare ([https://figshare.com/articles/figure/Appendix\\_MALDI\\_MSI\\_images\\_pdf/19590694](https://figshare.com/articles/figure/Appendix_MALDI_MSI_images_pdf/19590694))).

#### Thermal phase transitions in artificial CP mixtures

To assess the influence of different CP mixture components on water binding and thermal phase transitions, we compared heating curves from DSC scans of aqueous solutions containing single components or different CP mixtures with real SDA hemolymph. We focused on melting of bulk water (Fig. 3A) and glass transition (Fig. 3B). The full DSC analysis results can be found in Table S2.

We designed the CP mixtures according to the concentrations of the five most abundant (and commercially available/affordable) compounds in the SDA larval hemolymph. CP mix 508 mimics the composition of the major CPs in the hemolymph of SDA larvae prior to freezing, while CP mix 1588 takes into account a 3.125-fold increase in the concentration of all components resulting from extracellular freezing of osmotically active water (and, this way, it mimics the composition in the SDA-frozen variant). In addition, we tested all components individually at concentrations equivalent to those estimated in SDA hemolymph after extracellular freezing, and we also designed two reduced-composition mixes: Pro-Tre 1316 (proline 978+trehalose 338) and Pro-Gln-Asn 1231 (proline 978+glutamine 172+asparagine 81) (see Table S2 for details).

We found that depression of the bulk water melting point, as well as the fraction of ‘bound’ water (unfrozen, osmotically inactive water, %OIW), correlated linearly with the molal concentration of a



**Fig. 3. Thermal phase transitions in the aqueous solutions of artificial CP mixtures and individual components.** (A) Example of a heating curve recorded by differential scanning calorimetry (DSC) of the artificial CP mix 1588. Three technical replicates are shown in different colors. Results calculated by TA Universal Analysis 2000 software are shown for the 1st replicate only (green line). The analysis of melting endotherm shows that melting of bulk water starts at a melting point (m.p.) of  $-9.28^\circ\text{C}$ , while only 58.7% of the total water in the sample is osmotically active (OAW), i.e. melts (the enthalpy of melting transition of  $\Delta H$  of  $334 \text{ J g}^{-1}$  would correspond to melting of 100% total water) while 41.3% of total water is osmotically inactive (OIW) or ‘bound’. (B) A glass transition was observed at  $-48.5^\circ\text{C}$  ( $T_g$ , inflection point) associated with change in specific thermal capacity  $\Delta C_p$  of  $0.3289 \text{ J (g }^\circ\text{C}^{-1})^{-1}$ . (C) Linear associations of the melting point (m.p., red line) or the fraction of bound water (%OIW, blue line) with the osmolality of the solution. Each point represents a specific solution and all solutions are shown in detail in Table S2. Points corresponding to water, SDA hemolymph, and CP mixes 508 and 1588 are identified for clarity. The broken lines show 95% confidence intervals of the linear regressions. (D,E) Temperatures of the glass transition,  $T_g$  (D) and changes in thermal capacity,  $\Delta C_p$  (E) of the different solutions. Empty points in D or a missing column in E indicate that no glass transition was observed, while the violet points and orange columns show means.d. values of  $T_g$  or  $\Delta C_p$ , respectively, for solutions where a glass transition was observed (see Table S2 for the full dataset).



solution, regardless of whether it was a single component solution or a mixture. Even the values for real hemolymph collected from SDA larvae fitted well to a linear relationship (Fig. 3C).

A clear glass transition was observed whenever trehalose was present in a mixture (Fig. S10). The temperatures of glass transition ( $T_g$ ) in different trehalose-containing solutions varied from  $-29.6^\circ\text{C}$  (trehalose 338) to  $-49.7^\circ\text{C}$  (Pro-Tre 1316) (Fig. 3D). The change of thermal capacity ( $\Delta C_p$ ) during de-glassing was slightly above  $0.3 \text{ J (g } ^\circ\text{C)}^{-1}$  in the solutions containing a relatively high concentration of trehalose ( $338 \text{ mmol kg}^{-1}$ ) but lower,  $\sim 0.1 \text{ J (g } ^\circ\text{C)}^{-1}$ , in the solution containing a relatively low concentration of trehalose (CP mix 508 contains  $108 \text{ mmol kg}^{-1}$  of trehalose) and in real SDA hemolymph (which also contains  $108 \text{ mmol kg}^{-1}$  of trehalose) (Fig. 3E). No glass transition was observed in the concentrated proline 978 solution (Fig. S11). The presence of proline in a mixture with glutamine and asparagine (Pro-Gln-Asn 1231) resulted in the elimination of small glass transitions observed in single-component mixtures of glutamine or asparagine (Fig. 3D,E). We also observed minor exotherms in heating curves of glutamine and asparagine at  $-22.8^\circ\text{C}$  and  $-14.6^\circ\text{C}$ , respectively (Fig. S12). The presence of such exotherms was also eliminated by the addition of proline in the Pro-Gln-Asn 1231 mix (Table S2).

#### CPs in mixture protect larvae from cryopreservation stress better than individual CPs

To evaluate the ability of a complex cryoprotective mixture to increase freeze tolerance compared with individual components of the CP mix, we fed LD larvae with CP-augmented diets and then performed freezing survival assays. We prepared the CP mix 508 diet by augmenting the standard larval diet with a CP mix 508 solution (see Table S3). When LD larvae were fed with the CP mix 508 diet from hatching, more than 90% died (often as 1st instars). We therefore exposed only 3rd instar LD larvae to this diet and for only 3 days (at ages 17–19 days), which reduced larval mortality to 20%. The surviving larvae were significantly smaller at day 19 and pupariation was delayed by 2 days (Table S4), indicating that even short-term exposure to CP mix 508 appears to have some toxic effects.

A 3 day exposure to the CP mix 508 diet significantly increased whole-body concentrations of most CP mix components: proline

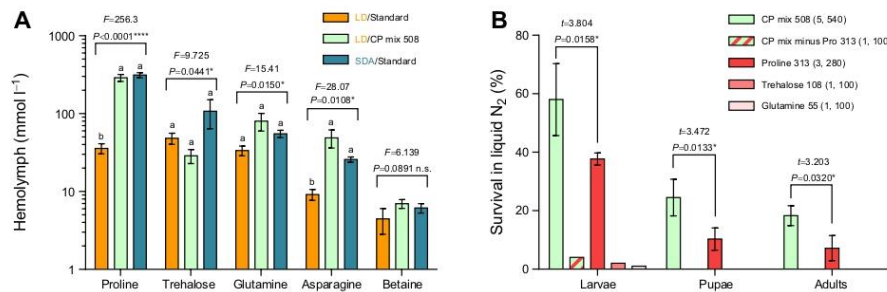
increased 6.8-fold, trehalose 1.7-fold, glutamine 5.4-fold and asparagine 19.9-fold (see Table S5 for more details). In the hemolymph, the concentrations of proline, glutamine and asparagine reached high levels of 289, 80 and  $49 \text{ mmol l}^{-1}$ , respectively, while trehalose and betaine remained relatively low at 29 and  $7 \text{ mmol l}^{-1}$ , respectively (Fig. 4A, see Table S5 for more details). The sum molarity of the five CPs in hemolymph reached  $454 \text{ mmol l}^{-1}$  in LD larvae fed with the CP mix 508 diet, which is broadly similar to the sum of  $508 \text{ mmol l}^{-1}$  seen in SDA larvae.

No LD larvae that fed exclusively on the standard diet survived cryopreservation in liquid  $\text{N}_2$ . In striking contrast, 58% of the LD larvae survived cryopreservation after only 3 days of feeding with the CP mix 508 diet; 24.5% went on to pupate and 18.3% successfully metamorphosed to the adult stage (Fig. 4B). The components of the CP mix 508 administered via the diet had much less (or no) effect on larval freeze tolerance when they acted in isolation: betaine and asparagine had absolutely no effect; glutamine and trehalose resulted in 1 and 2 larvae surviving (out of 100), respectively, but these larvae did not pupate; proline augmentation was most effective, resulting in 37.7%, 10.3% and 7.2% survival for larvae, pupae and adults, respectively. When proline was excluded from the CP mix, the remaining components allowed only 4 larvae (out of 100) to survive liquid  $\text{N}_2$  exposure, demonstrating that proline is the most important component of the mixture, or even the requisite for survival in liquid  $\text{N}_2$ . Nevertheless, the complete CP mix 508 was approximately 2-fold more effective at bolstering liquid  $\text{N}_2$  survival than proline alone. This result was consistent at all three levels of survival (see *t*-tests in Fig. 4B) and also across five different generations of assayed insects (Table S6). Simple addition of the individual effects of the three components (proline+trehalose+glutamine) was not sufficient to explain the effect of the complete CP mix 508. These results suggest a synergy between CP mix 508 components that should be investigated in the future.

#### DISCUSSION

##### Components of the fly's innate CP mixture behave differently during slow extracellular freezing

We identified the composition of the innate putative CP mixture which bathes the tissues of extremely freeze-tolerant *C. costata*



**Fig. 4. Effects of CP-augmented diets on *C. costata* larvae.** (A) Change in the hemolymph concentration of five CPs in response to feeding 17-day-old LD larvae a CP mix 508 diet for 3 days. Concentrations are compared with LD and SDA larvae fed on a standard diet, using one-way ANOVAs followed by Bonferroni's multiple comparison tests (columns flanked by different letters differ significantly). (B) Percentage survival of larvae cryopreserved in liquid  $\text{N}_2$  (note: only diets where at least one larva survived are shown). The 17-day-old LD larvae were fed different diets for 3 days, then exposed to liquid  $\text{N}_2$  for 1 h, returned to the standard diet at a constant  $18^\circ\text{C}$ , and their survival to larval (movements 24 h later), pupal (formation of puparium) and adult stage (emergence of adult fly) were observed over the next 14 days. The two numbers in parentheses (*n*, *N*) show: *n*—the number of fly generations, and *N*—the total number of larvae in all replicates. The mean survival for larvae fed a CP mix 508 diet versus a proline diet (Pro 313) were directly compared using a two-tailed Student's *t*-test. Asterisk indicates a significant difference; n.s., not significant.

larvae: proline, trehalose, glutamine, asparagine, betaine, GPE, GPC and sarcosine, which occur in hemolymph in a stoichiometric ratio of 313:108:55:26:6:4:2.9:0.5 mmol l<sup>-1</sup>, respectively. It may not be surprising that the mixture is broadly similar to the cocktails known from other organisms exposed to various environmental stressors (Gertrudes et al., 2017; Choi et al., 2011; Somero, 1986; Yancey, 2005). The occurrence of the same classes of organic cytoprotectants and compatible osmolytes in different organisms is likely based on convergent evolution which favors accumulation of polar molecules with high solubility in water (high accumulation capacity) countered by low tendency to interact with charged groups of macromolecules and membranes (low toxicity) (Hochachka and Somero, 2002).

We performed a bioassay showing that supplementation of the larval diet with major components of the CP mixture in their native stoichiometric ratio changes freeze-sensitive larvae into freeze-tolerant/cryopreservable larvae within just 3 days. This result convincingly demonstrates that the accumulation of CPs has a strong functional (adaptive) significance in *C. costata*. However, this adaptation has probably evolved to cope with conditions typical for larvae overwintering in thermally buffered microhabitats under the bark of fallen trees, often under a blanket of snow (Band and Band, 1982; Grimaldi, 1986). Therefore, there may be different functional explanations for the roles of CPs in ecologically relevant situation in the field and for deep freezing and cryopreservation in liquid N<sub>2</sub> in the laboratory. Here, we avoid discussion of the eco-physiological aspects of CP-based freeze tolerance in animals and insects in the field, as these have already been covered for animals (Sinclair, 1999; Storey and Storey, 1988; Toxopeus and Sinclair, 2018; Zachariassen, 1985) and also specifically for *C. costata* (Rozsypal et al., 2018) elsewhere. Instead, we limit further discussion to the potential relevance of our results for deep freezing and cryopreservation in the laboratory.

We applied the MALDI-MSI technique to localize CPs in larval tissues and, for the first time in cryobiology literature, to determine how this localization changes during slow extracellular freezing, i.e. under conditions that allow larvae to survive deep freezing and subsequent cryopreservation in liquid N<sub>2</sub>. So far, concentrations of CPs in insects have mostly been reported in whole body samples for two general reasons: first, insect tissues are small, making it technically difficult to estimate precise concentrations; and second, native CPs – being standard products of metabolism – have been considered to move freely across membranes (Somero, 1986). In cases where CP analyses were performed on separate tissues (Košťál et al., 2011a; Rozsypal et al., 2013; Toxopeus et al., 2019), the CPs were generally found in all examined tissues. Here, we have confirmed that SDA larvae of *C. costata* accumulate putative CPs in all examined tissues but that the highest concentrations occur in the hemolymph.

One of the most salient findings of this study is the observation that the two major components of the CP mixture, proline and trehalose, 'behave' differently during slow extracellular freezing. The MALDI-MSI analysis suggests that the bulk of trehalose molecules remain in their original location (before freezing) and concentrate in partially freeze-dehydrated hemolymph and tissues. In contrast, some of proline molecules appear to move out of the hemolymph and concentrate in thin layers separating the extracellular ice crystals from freeze-dehydrated tissues and hemolymph. At this stage of research, we can only offer hypothetical/speculative explanations for the physico-chemical mechanisms responsible for delocalization of proline and trehalose and for its possible functional significance in a

cryopreserved insect. We suggest that the mechanism behind the de-localization could be explained by differences between trehalose and proline in water solubility, propensity to induce glass transition, and mobility in highly viscous freeze-concentrated solutions.

#### Trehalose stimulates glass transition in partially freeze-dehydrated hemolymph and tissues

We have previously shown that in gradually frozen SDA larvae a glass transition of the residual solution occurs between -20°C and -30°C. Moreover, only larvae pre-frozen to temperatures below -30°C (i.e. below the temperature of glass transition) were able to survive abrupt submersion and cryopreservation in liquid N<sub>2</sub> and successfully develop into adults (Rozsypal et al., 2018). This result clearly demonstrated the importance of the glass transition for survival in liquid N<sub>2</sub>. In our earlier work (Rozsypal et al., 2018), we attributed glass formation to high concentrations of proline in accordance with results of the DSC analysis performed by Rudolph and Crowe (1986). However, this observation was challenged in later DSC studies (Liu et al., 2020; Rasmussen et al., 1997) and our own analysis confirms that proline at a concentration of 978 mmol kg<sup>-1</sup> does not induce glass transition, at least not at temperatures above -60°C. Instead, trehalose is known in physical chemistry as one of the strongest glass transition inducers in aqueous systems (Cesaro et al., 2008; Green and Angell, 1989; Chen et al., 2000). Nicolajsen and Hvidt (1994) reported that a water:trehalose mixture (%weight, 89.7:10.3) de-glasses at -30.5°C with a  $\Delta C_p$  of 0.38 J (g °C)<sup>-1</sup>. These values agree well with our DSC analysis results showing de-glassing at -29.6°C with a  $\Delta C_p$  of 0.33 J (g °C)<sup>-1</sup> for the trehalose 338 solution (which is 88.7:11.3%weight of water:trehalose). Accurate interpretation of the thermal behavior and glass transition parameters is a challenge for physical chemistry of simple binary mixtures such as trehalose: water (Cesaro et al., 2008; Chen et al., 2000; Nicolajsen and Hvidt, 1994; Olgenblum et al., 2020; Weng and Elliott, 2014). This limitation becomes almost insurmountable for more complex mixtures and, especially, for biological solutions. Nevertheless, our DSC analysis suggests that trehalose rather than proline may be the component mainly responsible for the glass transition in larval body fluids: (i) all artificial CP mixtures containing trehalose showed clear glass transitions with broadly similar  $T_g$  and  $\Delta C_p$  parameters; (ii) the parameters were similar for real hemolymph collected from SDA larvae (containing 108 mmol l<sup>-1</sup> trehalose) and for the artificial CP mix 508 (simulating composition of major CPs in SDA hemolymph and also containing 108 mmol kg<sup>-1</sup> trehalose); (iii) no glass transition was observed in the concentrated proline 978 solution.

During glass transition, the viscosity of the supercooled liquid increases rapidly as the frequency, strength and lifetime of hydrogen bonds in a system increases. In dilute systems, most hydrogen bonds are formed between water molecules, but as the concentration of solute molecules increases the interactions between water-trehalose and trehalose-trehalose become more frequent until trehalose molecules form large hydrogen-bonded clusters that exclude water (Olgenblum et al., 2020; Weng and Elliott, 2014). The increase in viscosity slows the molecular dynamics and macromolecules become trapped in an amorphous hydrogen-bonded matrix, which probably prevents undesirable transitions such as protein unfolding. In addition, trehalose can directly form hydrogen bonds with macromolecules, which probably further increases their stability in the amorphous glass (Crowe et al., 1998; Olgenblum et al., 2020). Trehalose molecules involved in glass formation are relative immobile. Moreover, large proportions of water molecules are

'bound', i.e. osmotically inactive in SDA larval hemolymph (35.5%) or in whole-body *C. costata* (42%; Rozsypal et al., 2018) and therefore do not contribute much to trehalose solvation. As a result, trehalose can even locally reach the solubility limit ( $\sim 1.7 \text{ mol kg}^{-1}$  according to ALOGPS, <http://www.vclab.org/lab/alogps/>), partly crystallize and form a eutectic system with ice crystals. Both crystallization and glass formation would make trehalose molecules immobile, i.e. gradually concentrated in dehydrated tissues and hemolymph, which we observed.

#### Proline-rich viscoelastic liquid forms at the boundary between extracellular ice and dehydrated tissues

In contrast to trehalose, proline does not induce a glass transition (Liu et al., 2020; Rasmussen et al., 1997) and its solubility in water is enormous (it may reach over  $15 \text{ mol kg}^{-1}$ ; Held et al., 2014; Qiu et al., 2019). Nevertheless, physical chemistry shows that proline in high concentration also extensively hydrogen bonds with water and together they form a viscoelastic liquid (de Molina et al., 2017; McLain et al., 2007; Troitzsch et al., 2008). The formation of dense, viscoelastic liquids is a guiding principle underlying the theory of NADES systems (Choi et al., 2011). The components in a complex mixture forming NADES are connected to one another through a well-organized tridimensional system with optimum interactions via inter- and intramolecular hydrogen bonding (Dai et al., 2013; Dai et al., 2015). Through these interactions, NADES systems exhibit emergent properties: (i) the melting point is deeply suppressed (usually below  $-30^\circ\text{C}$ ); (ii) ice crystallization is completely (or at least strongly) inhibited; whereas (iii) the tendency to transition to amorphous glasses is enhanced (Castro et al., 2018; Liu et al., 2018; Martins et al., 2019). However, work with NADES has also shown that the interactions between the NADES components are weakened with water dilution and even broken with water content exceeding 50% weight, when each component recovers its own specific properties (Castro et al., 2018; Dai et al., 2015; Durand et al., 2016). Our artificial CP mixtures have relatively high water content (between 79 and 99%weight), as do the SDA larval hemolymph (74.4%weight) and whole larvae (69.3%weight). Using DSC analysis, we show that these solutions exhibit significant suppression of the melting point (e.g. to  $-9.2^\circ\text{C}$  in CP mix 1588, and to  $-4.5^\circ\text{C}$  in SDA hemolymph) and significant water-binding capacity (41.1%OIW in CP mix 1588, and 35.5%OIW in SDA hemolymph). Both parameters (the decrease in melting point and the increase in OIW fraction) were linearly dependent on the osmolality of a solution (from 0 for water to  $1588 \text{ mmol kg}^{-1}$  for CP mix 1588). These results suggest that neither the CP mixes 508 and 1588 nor the SDA hemolymph are 'deep eutectic systems' (DES, in the strict sense of Martins et al., 2019), but regular aqueous solutions with relatively low transition temperature from liquid to solid phase [LTSM, in the sense of Durand et al. (2016)].

We suggest that a proline-dominated viscoelastic solution with NADES-like properties may form on a microscale level, locally, in slowly freeze-dehydrating larvae. As water molecules are osmotically driven from the gradually dehydrating hemolymph and tissues and migrate toward the extracellular ice during extracellular freezing, the highly soluble and relatively mobile proline molecules could move together with water until they reach a barrier of ice where they form a thin layer of concentrated proline, which we observed in MALDI-MSI. Such a viscoelastic liquid could contribute to the stabilization of deeply frozen *C. costata* larvae by forming a rubber-like zone between extracellular ice crystals and freeze-dehydrated tissues, thus reducing the thermo-mechanical stresses associated with

temperature fluctuations during immersion in liquid  $\text{N}_2$  and rewarming (Rubinsky et al., 1980).

#### Conclusion

Overall, our study reveals the composition of a specific mixture of putative cryoprotectants accumulated by the freeze-tolerant larvae of *C. costata*. We demonstrate in a bioassay that as little as 3 days of exposure to a diet enriched with an artificial mixture of CPs allows an otherwise freeze-sensitive larva to survive not only deep freezing but also cryopreservation in liquid  $\text{N}_2$ . The components of CP mixture act synergistically rather than additively to improve the freeze tolerance. These findings open avenues for functional experiments to better understand the mechanisms underlying cryoprotection and cryopreservation of complex multicellular organisms. Toward this goal, we demonstrate that the accumulated CPs suppress the melting point of body water, increase the fraction of osmotically inactive water and significantly reduce the ice fraction. During slow extracellular freezing of whole larvae, trehalose becomes concentrated in the partially dehydrated hemolymph and tissues and stimulates glass transition, whereas proline moves to the boundary between extracellular ice and dehydrated tissues where it probably creates a layer of dense viscoelastic liquid. We suggest that these mechanisms contribute to larval extreme freeze tolerance and enable their cryopreservation by protecting their cells against thermomechanical shocks associated with freezing and transfers into and out of liquid  $\text{N}_2$ .

#### Acknowledgements

We thank Irena Vacková, Jana Járová, and Karolína Kowalska for maintenance of *C. costata* colonies, processing samples for metabolomics, and assistance during preparation of MALDI-MSI samples, respectively.

#### Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

#### Author contributions

Conceptualization: V.K.; Methodology: M.F., P.Š., R.S., V.K.; Validation: M.F., P.Š., R.S., V.K.; Formal analysis: L.K., M.M., V.K.; Investigation: L.K., M.M., T.Š., J.K., P.V., L.D., R.G., P.H., J.R., M.F.; Writing - original draft: V.K.; Writing - review & editing: L.K., M.M., T.Š., J.K., P.V., L.D., R.G., P.H., J.R., M.F., P.Š., R.S.; Visualization: V.K.; Supervision: P.Š., R.S., V.K.; Project administration: V.K.; Funding acquisition: M.F., P.Š., R.S., V.K.

#### Funding

This study was supported by a Grantová Agentura České Republiky (GAČR; 19-13381S to V.K.). Development of metabolomics platforms were supported by GAČR 17-22276S to P.Š. The MALDI-MS analysis was supported by the Czech Academy of Science (Akademie věd České Republiky, RVO 68378050), Ministry of Education, Youth and Sports (Ministerstvo Školství, Mládeže a Tělovýchovy, LM2018126) in cooperation with European Structural and Investing Funds (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_013/0001789 to R.S.). The DSC analysis was supported by the Ministry of Agriculture [Ministerstvo Zemědělství (MZE) RO0418 to M.F.].

#### Data availability

All MALDI-MSI images are available from figshare: [https://figshare.com/articles/figure/Appendix\\_MALDI\\_MSI\\_images\\_pdf/19590694](https://figshare.com/articles/figure/Appendix_MALDI_MSI_images_pdf/19590694).

#### References

- Asahina, E. (1970). Frost resistance in insects. In *Advances in Insect Physiology* (ed. R. Jurenka), Vol. 6, pp. 1-49. Elsevier. doi:10.1016/S0065-2806(08)60109-5
- Band, H. T. and Band, R. N. (1982). Multiple overwintering mechanisms in *Chymomyza amoeba* larvae (Diptera: Drosophilidae) and laboratory induction of freeze tolerance. *Experientia* **38**, 1448-1449. doi:10.1007/BF01955762
- Bankhead, P., Loughrey, M. B., Fernández, J. A., Dombrowski, Y., McArt, D. G., Dunne, P. D., McQuaid, S., Gray, R. T., Murray, L. J. and Coleman, H. G. (2017). QuPath: open source software for digital pathology image analysis. *Sci. Rep.* **7**, 1-7. doi:10.1038/s41598-017-17204-5
- Castro, V. I. B., Craveiro, R., Silva, J. M., Reis, R. L., Paiva, A. and Cuarte, A. R. (2018). Natural deep eutectic systems as alternative



- Štětina, T., Hůla, P., Moos, M., Šimek, P., Šmilauer, P. Košťál, V. (2018). Recovery from supercooling, freezing, and cryopreservation stress in larvae of the drosophilid fly, *Chymomyza costata*. *Sci. Rep.* **8**, 4414. doi:10.1038/s41598-018-22757-0
- Toxopeus, J. and Sinclair, B. J. (2018). Mechanisms underlying insect freeze tolerance. *Biol. Rev.* **93**, 1891-1914. doi:10.1111/brv.12425
- Toxopeus, J., Košťál, V. and Sinclair, B. J. (2019). Evidence for non-colligative function of small cryoprotectants in a freeze-tolerant insect. *Proc. R. Soc. B* **286**, 20190050. doi:10.1098/rspb.2019.0050
- Troitzsch, R. Z., Vass, H., Hossack, W. J., Martyna, G. J. and Crain, J. (2008). Molecular mechanisms of cryoprotection in aqueous proline: light scattering and molecular dynamics simulations. *J. Phys. Chem.* **112**, 4290-4297. doi:10.1021/jp076713m
- Tuthill, B. F., II, Searcy, L. A., Yost, R. A. and Musselman, L. P. (2020). Tissue-specific analysis of lipid species in *Drosophila* during overnutrition by UHPLC-MS/MS and MALDI-MSI. *J. Lip. Res.* **61**, 275-290. doi:10.1194/jlr.RA119000198
- Weng, L. and Elliott, G. D. (2014). Dynamic and thermodynamic characteristics associated with the glass transition of amorphous trehalose-water mixtures. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 11555-11565. doi:10.1039/C3CP55418J
- Wishart, D. S., Feunang, Y. D., Marcu, A., Guo, A. C., Liang, K., Vázquez-Fresno, R., Sajed, T., Johnson, D., Li, C. and Karu, N. (2018). HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res.* **46**, D608-D617. doi:10.1093/nar/gkx1089
- Yancey, P. H. (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J. Exp. Biol.* **208**, 2819-2830. doi:10.1242/jeb.01730
- Yang, F. Y., Chen, J. H., Ruan, Q. Q., Saqib, H. S., He, W. Y. and You, M. S. (2020). Mass spectrometry imaging: an emerging technology for the analysis of metabolites in insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **103**, e21643. doi:10.1002/arch.21643
- Zachariassen, K. E. (1985). Physiology of cold tolerance in insects. *Physiol. Rev.* **65**, 799-832. doi:10.1152/physrev.1985.65.4.799