Journal of Stress Physiology & Biochemistry, Vol. 14, No. 2, 2018, pp. 26-35 ISSN 1997-0838
Original Text Copyright © 2018 by Bedulina, Shatilina, Axenov-Gribanov, Lubyaga, and Timofeyev

ORIGINAL ARTICLE

OPEN ACCESS

Estimation of Basal HSP70 Levels in Two Thermotolerant Baikal Amphipod Species from Different Thermal Habitats

D.S. Bedulina[1]*, Z.M. Shatilina[1,2], D.V. Axenov-Gribanov [1,2], Y.A. Lubyaga [1,2], M.A. Timofeyev [1]

[1] *Institute of Biology at Irkutsk State University, Irkutsk, 3 Lenin str., Russia*

[2] *Baikal Research Centre, Irkutsk, 21 Lenin str., Russia*

*E-Mail: ***daria.bedulina@gmail.com***

Received June 12, 2018

In two thermotolerant amphipod species from Lake Baikal - *Eulimnogammarus cyaneus* (Dybowsky, 1874) and *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing, 1899), sampled at different habitat temperatures – the level of Hsp70 was estimated. Both species have a significantly higher Hsp70 level, than other dominant amphipods within the littoral zone of the lake. Baikal endemic species *E. cyaneus*, sampled within a range of thermal condition - from 2 to 22°C did not show any significant correlation between the basal Hsp70 level and sampling temperature. However, the level of Hsp70 in *G. fasciatus* depended the habitat temperature and was significantly higher in amphipods sampled at the hot spring at 29°C, than in the open shore of southern Baikal at 8°C. The observed results can be explained by different evolutionary age of the studied species, indicating that the putative tertiary relict *G. fasciatus* has adaptive advantages allowing this species widely distribute beyond its habitat.

Key words: Hsp70, amphipods, Baikal, temperature

Белки теплового шока (БТШ, Hsp) - универсальный клеточный механизм защиты от протеотоксических воздействий разного рода (Lindquist *and* Craig, 1998). Среди множества семейств наиболее изученным являются БТШ с молекулярной массой около 70 кДа – БТШ70, выполняющие функцию молекулярных шаперонов. Эти белки широко применяются в экологических и эволюционных исследованиях за счет их свойств универсальных клеточных биомаркеров стресс-ответа, а также роли в адаптации и приобретении толерантности при распространении видов по разным широтам и условиям с различным давлением абиотических и биотических факторов среды (Tomanek, 2008). Микроэволюционные преобразования мультигенного семейства *бтш70* при развитии термотолерантности и адаптации к новым условиям среды включают увеличение числа копий генов этих белков в геноме, изменение их транскрипционной активности, а также увеличение уровня соответствующих белков в протеоме (Evgen'ev *et al*., 2004; Zatsepina *et al*., 2000; Papot *et al*., 2016). На внутривидовом уровне БТШ70 играют важную роль в развитии фенотипической пластичности при распространении видов и последующей адаптации к температурным условиям (Hamdoun *et al*., 2003).

Изучение адаптивного потенциала ключевых пресноводных видов очень важно в свете глобальных климатических изменений. Озеро Байкал представляет собой уникальную модель для проведения подобных исследований. Особую роль играет разнообразная фауна эндемичных беспозвоночных, обладающая повышенным уровнем адаптивной радиации (Kozhova *and* Izmesteva, 1999). Наиболее многочисленная по видовому составу группа организмов принадлежит к отряду высших ракообразных - амфиподам (Crustacea, Amphipoda). В озере насчитывается 350 эндемичных видов и подвидов (Takhteev *et al*., 2015). Байкальские амфиподы отличаются высокой степенью адаптивной радиации, представлены обширным диапазоном форм и размеров, различными экологическими предпочтениями и обитают в широком диапазоне глубин: от верхних отделов литорали до максимальных глубин (Тахтеев *и* Галимзянова, 2000).

Глобальное изменение климата, влияние которого уже отмечают в прибрежной зоне озера Байкал (Potemkina *et al*., 2018), может негативно сказаться на обитающих там сообществах амфипод (Jakob *et al*., 2016). В этой связи, особый интерес представляют адаптивные способности видов эврибионтов, которые могут заменить доминирующую в литорали термочувствительную фауну. Самыми распространенными из таких видов являются эндемики *Eulimnogammarus cyaneus* (Dybowsky, 1874) и *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing, 1899). Оба вида отличаются высокой термотолерантностью и способны обитать в широком диапазоне температур в верхних отделах литорали озера Байкал, а представители вида *Gmelinoides fasciatus*, кроме того, обнаружены в горячих источниках при температуре 29 °C (Тахтеев *и* Галимзянова, 2009). Мы предполагаем, что система БТШ70 обеспечивает высокий адаптивный потенциал к обитанию при разнообразных температурных условиях, что может являться преимуществом этих двух видов перед другими видами литоральных амфипод в условиях глобального потепления.

Целью настоящего исследования явилась оценка содержания БТШ70 у байкальских амфипод, выловленных при разных температурах в пределах прибрежной зоны озера Байкал и выявление

возможной роли этих белков в развитии высокой степени термотолерантности изучаемых видов.

MATERIALS AND METHODS

Исследуемые виды

E. cyaneus (11-15 мм) - типичный представитель верхних отделов литорали оз. Байкал, который населяет каменистые пляжи озера по всей его береговой линии на глубинах от 0 до 20 м, при этом формируя скопления в узкой зоне в полосе прибоя, где отмечаются максимальные колебания температур – от 0 до 21 ℃ в открытой литорали, и до 25-26 ℃ - в бухтах и заливах (Вейнберг, 1995). Для *E. cyaneus* экспериментально показана повышенная термотолерантность, по сравнению с другими представителями рода *Eulimnogammarus*, широко представленными в литорали. Выявлено, что такая высокая термотолерантность *E. cyaneus* обеспечена пятикратным превышением содержания БТШ70, по сравнению с другим, доминирующим в литорали, близкородственным видом *Eulimnogammarus verrucosus*, увеличенным количеством генов *бтш70* в геноме и изоформ БТШ70 в протеоме, а также более эффективной регуляцией экспрессии стресс-индуцированных форм *бтш70* (Bedulina *et al.*, 2013). По экспериментальным данным, температура преферендума для этого вида лежит в диапазоне 11-12 ℃ (Тимофеев *и* Кириченко, 2004).

G. fasciatus (9-15 мм) - типичный литоральный вид, распространенный по всему Байкалу на глубинах от 0 до 5 м, иногда встречающийся на глубине до 100 м (Снимщикова,1977; Черепанов *и др.*, 1977). Является одним из предполагаемых теплолюбивых реликтов третичного периода в фауне Байкала (Тахтеев *и* Галимзянова, 2009; Naumenko *et al.*, 2017). Данный вид обнаружен в ряде термальных источников в окрестностях Байкала (Золотой Ключ, Гусихинский, Киронский, Верхняя Заимка), в водах которых обитает в массовом количестве при температурах до 29ºС (Тахтеев *и* Галимзянова, 2009). Кроме того, *G. fasciatus* является единственным байкальским видом амфипод, сумевшим преодолеть барьер «несмешиваемости» и широко распространиться за пределы озера по всей длине Ангары и в Енисее до губы включительно. Вид известен тем, что был искусственно акклиматизирован во многих водоемах европейской и азиатской частей России, где успешно прижился (Мордухай-Болтовской *и* Чиркова, 1971; Нилова, 1976), в дальнейшем распространившись далеко за пределы водоемов, в которые он был первоначально интродуцирован (Panov *and* Berezina, 2002). Обладает повышенной термотолерантностью и высоким базовым уровнем БТШ70 по сравнению с другими литоральными видами амфипод (Тимофеев, 2010). При экспериментальных исследованиях особи вида проявили предпочтение температурной зоны 17-18℃ (Тимофеев *и* Кириченко 2004).

Отлов и содержание амфипод

Отбор проб производили в ходе летней кругобайкальской экспедиции. Карта точек вылова и параметры условий среды представлены на рисунке 1 и в таблице 1. Амфипод отлавливали с уреза воды стандартным гидробиологическим методом. Для исследования отбирали взрослых, активно плавающих рачков одной размерно-возрастной группы, избегая пар амфипод и самок с яйцами. Рачков фиксировали в жидком азоте сразу после вылова. Пробы до биохимической обработки хранили в жидком азоте.

Определение конститутивных уровней БТШ70

Выделение общего белка проводили в 0.1 М Трис HCl буфере (pH 7.6). Для выделения белка брали 10

Table 1 Описание точек сбора *E. cyaneus* и *G. fasciatus*

N	Название	Координаты	Описание и температура
Eulimnogammarus cyaneus			
1.	О. Ольхон, Бухта Хорин-Ирги (Хул)	53° 4'9.76" СШ 106°55'28.62"ВД	Грунт - каменисто-илистый, температура при сборе 13°С
2.	Байкало-Ленский заповедник, мыс Большой Солонцовый	54°10'13.37"СШ 108°22'15.58"ВД	Грунт – каменистый, температура 5°С
3.	Мыс Котельниковский	55° 4'0.12"СШ 109° 6'24.20"ВД	Урез воды оз. Байкал рядом с горячими источниками, грунт – каменистый, температура-3°С
4.	Акватория Забайкальского нац. парка, мыс Самаринский	53°52'19.10"СШ 109°14'38.84"ВД	Грунт – крупные камни, температура- 2°С
5.	Чивыркуйский залив, бух. Змеёвая	53°45'58.07"СШ 109° 1'37.54"ВД	На берегу горячие сероводородные источники с температурой »44°С. На урезе воды оз Байкал грунт – мелкие камни, песок, черный ил, макрофиты (элодея) обильно, температура при сборе 22°С
6.	Чивыркуйский залив, бух. Онкагон	53°47'32.90"СШ 109° 3'27.92"ВД	Грунт – каменисто-песчанистый, температура 16°С
7.	Ушканьи острова, о. Большой Ушканий	53°51'1.61"СШ 108°39'27.60"ВД	Грунт – каменисто-песчанистый, температура 16°С
8.	Пос. Большие Коты	51°54'11.46"СШ 105° 4'8.55"ВД	Грунт – каменисто-песчанистый, температура 8°С
Gmelinoides fasciatus			
1.	Мыс Котельниковский, горячие источники	55° 4'0.12"СШ 109° 6'24.20"ВД	Горячие минеральные источники, сбор в протоке между выходом источника и Байкалом, грунт-каменистый, температура в месте сбора - 29°С.
2.	Чивыркуйский залив, бух. Монахово	53°40'37.56"СШ 109° 1'35.75"ВД	В изобилии макрофиты, грунт - каменисто-песчанистый, температура 25°С
3.	Пос. Большие Коты	51°54'11.46"СШ 105° 4'8.55"ВД	Грунт – каменисто-песчанистый, температура 8°С

особей *E. cyaneus* и 20 особей *G. fasciatus* на одну пробу.

Количество белка в пробах определяли по методу М. Брэдфорд (Bradford, 1976) при длине волны 595 нм. Динамику содержания БТШ70 определяли стандартным методом денатурирующего электрофореза с ДДС-Na в 12.5 % полиакриламидном геле (Laemmli, 1970) с последующим Вестерн блоттингом. Выровненность белка контролировали, окрашивая мембраны раствором красителя Ponceau 4R. Для анализа использовали только мембраны с одинаковым количеством белка на каждой дорожке. Для визуализации БТШ70 полученные мембраны инкубировали сначала с антителами к БТШ70 (мышиные антитела к БТШ70; Sigma-Aldrich, #H5147,

разведение 1:1000). Затем, после промывания от непрореагировавших антител, мембраны инкубировали в растворе вторичных антител, конъюгированных с щелочной фосфатазой (антитела к иммуноглобулину мыши IgG:AP Conj., Sigma-Aldrich # A3562, разведение 1:1000). Полуколичественный анализ содержания исследуемого белка на мембранах проводили с использованием пакета программ ImageJ (v.1.41., Wayne Rasband, NIH, USA). Относительное содержание белка выражено в условных единицах оптической плотности участков связывания антител к БТШ70.

RESULTS AND DISCUSSION

Уровень конститутивного синтеза БТШ70 у зафиксированных сразу после сбора *E. cyaneus* варьировал незначительно (Figure 2). Наибольшее содержание БТШ70 отмечали у образцов, выловленных на урезе м. Котельниковский (Сев. Байкал) при температуре в момент вылова 3 ℃. Закономерности, связанной с температурой обитания, в полученных уровнях содержания БТШ70 не выявили. Так, у рачков выловленных в бухте Б. Коты при 8 ℃ уровень БТШ70 не отличается от такового у особей, выловленных в бухте Змеевая при 22℃ (Figure 2).

При анализе уровня конститутивного синтеза БТШ70 у другого исследуемого вида - *G. fasciatus*, была обнаружена корреляция между содержанием белков БТШ70 и температурой вылова (Figure 3). Так, наименьшее содержание БТШ70 отмечали в образцах особей, выловленных в районе Южного Байкала (пос. Большие Коты) при наименьшей из представленных в исследовании температур – 8 ℃. У амфипод, собранных в Чивыркуйском заливе (Центральный Байкал) при 25 ℃ уровень изучаемых стрессовых белков был значительно выше. Наибольшую интенсивность конститутивного синтеза отмечали у рачков, собранных в протоке гидротермального источника на мысе Котельниковский (Сев. Байкал) при 29 ℃ (Figure 3).

По литературным данным известно, что конститутивные уровни БТШ70 у двух исследованных видов, акклимированных к одинаковым температурным условиям, практически не отличаются и намного превосходят уровни этих белков у других доминирующих видов литоральных амфипод (Тимофеев, 2010). Оба вида в условиях экспериментальной экспозиции при повышенной температуре среды демонстрируют реакцию увеличения содержания БТШ70. Однако, у *E. cyaneus* степень повышения содержания этих белков относительно контроля как при остром температурном стрессе (25 ℃), так и при постепенном повышении температуры (со скоростью 1 ℃ в час с 6 до 29 ℃) относительна невелика – не более чем в два раза (Bedulina *et al*., 2013; Тимофеев, 2010). Тогда как у *G. fasciatus* при экспериментальной экспозиции (25 ℃) отмечали повышение содержания БТШ70 более чем в восемь раз относительно контроля (Тимофеев, 2010; Shatilina *et al*., 2011).

Согласно современному представлению, высокий конститутивный уровень БТШ70 в клетках многих немодельных организмов является следствием адаптации к выраженным температурным флуктуациям, что позволяет не затрачивать дополнительные энергетические ресурсы на синтез новых БТШ70 при развитии клеточного стресса (Garbuz *and* Evgen`ev, 2017). Это подтверждают полученные нами ранее данные на байкальских (Bedulina *et al*., 2013) и балтийских видах амфипод (Bedulina *et al*., 2010). Полученные в ходе настоящего исследования данные частично согласуются с

изложенной концепцией, поскольку уровень БТШ70 у представителей *E. cyaneus*, выловленных в градиенте температурных условий – от 2 до 22 ℃, флуктуирует незначительно и не коррелирует с температурой вылова.

Однако, у другого исследованного нами вида наблюдается иная картина. Не смотря на изначально высокий уровень БТШ70, содержание этого белка у особей, выловленных в Чивыркуйском заливе при 25 ℃ примерно в три раза выше, чем у рачков, выловленных в пос. Большие Коты при 8 ℃, а содержание БТШ70 у рачков из горячего источника (29 ℃) в восемь раз превышает уровень этих белков у популяции из Больших Котов. Причина такой реакции системы БТШ70 на температуру у этого вида может крыться в видоспецифических особенностях структуры и функционирования этого белкового семейства.

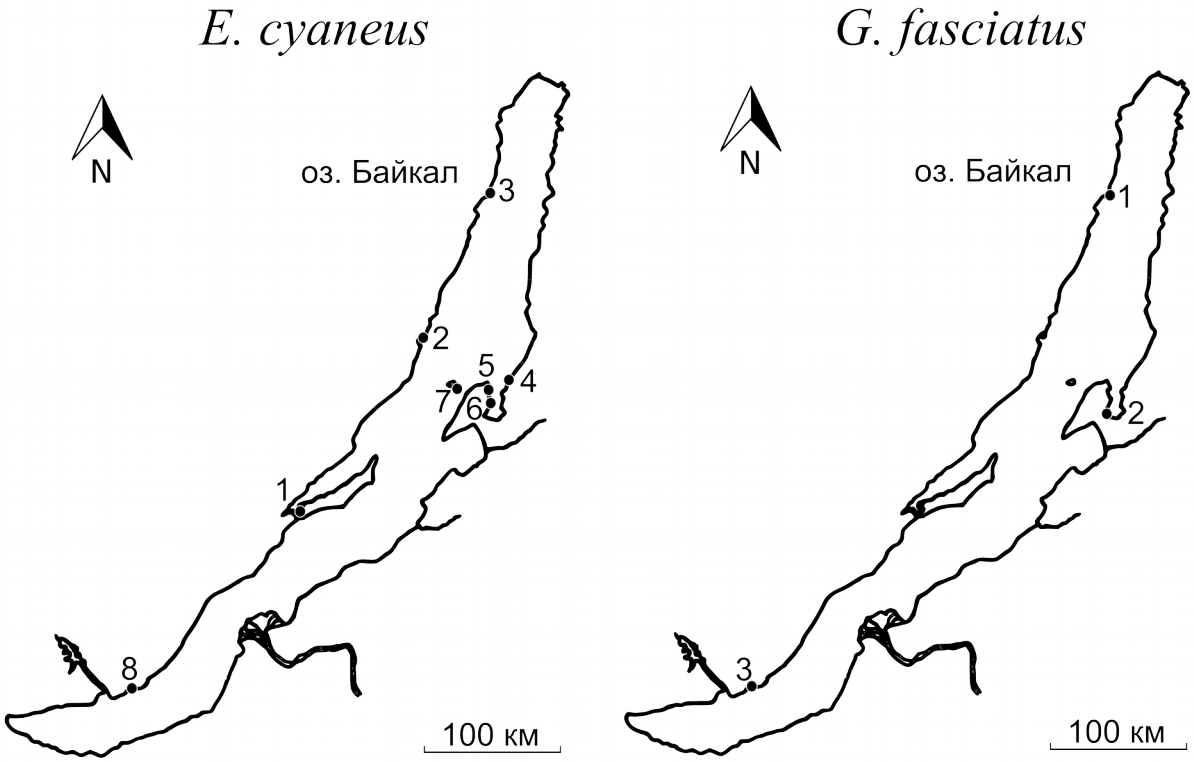

Figure 1. Карта точек вылова *E. cyaneus* и *G. fasciatus*. Амфипод отлавливали с уреза воды и фиксировали в жидком азоте в течение 15 минут после вылова. Описание точек вылова представлено в таблице 1.

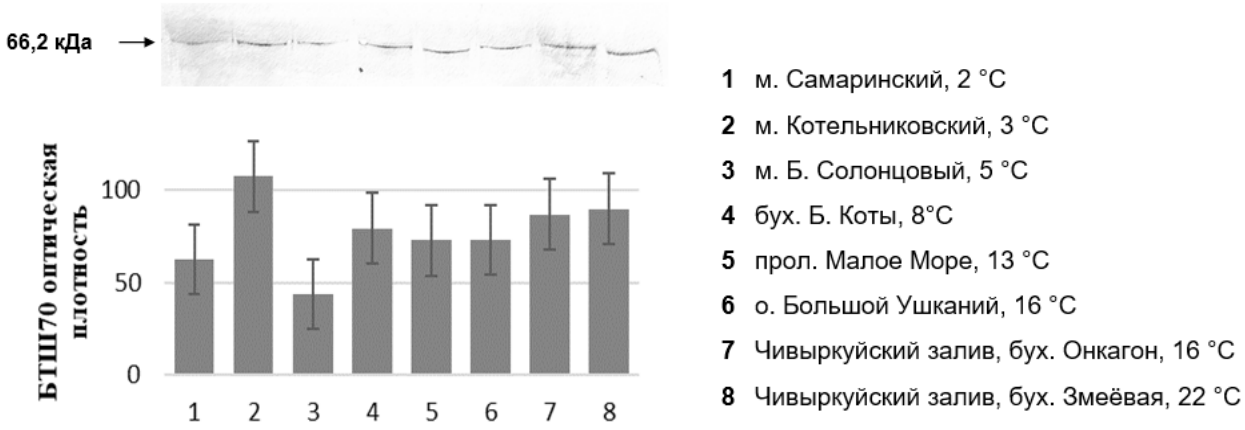

Figure 2. Содержание БТШ70 у *E. cyaneus*, выловленных в различных точках озера Байкал и зафиксированных непосредственно после вылова.

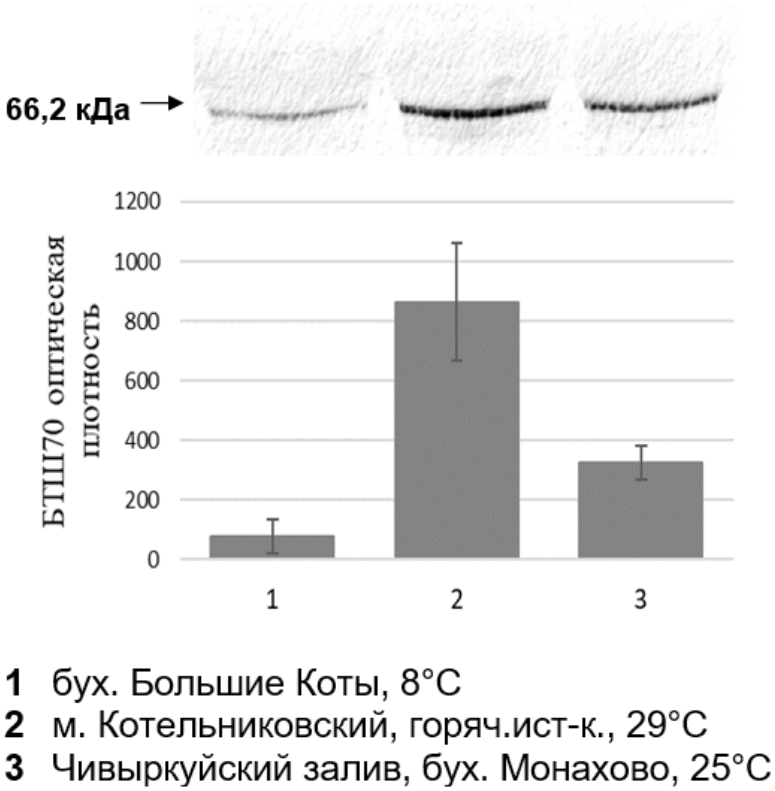

Figure 3. Содержание БТШ70 у *G. fasciatus,* выловленных в различных точках озера Байкал и зафиксированных непосредственно после вылова.

Известно, что БТШ70 представлены в клетках конститутивными и стресс-индуцибельными формами (Lindquist *and* Craig, 1998). По данным предыдущего исследования у амфипод обнаружен как достаточно высокий межвидовой полиморфизм числа генов и белков БТШ70, так и функционирования генов, выражающийся в различной структуре промоторов и разной степени связывания факторов теплового шока с элементами теплового шока для обеспечения стресс-индуцируемой экспрессии (Bedulina *et al*., 2013). Вероятно, что *G. fasciatus* обладает определенными видоспецифичными особенностями семейства БТШ70, которые сформировались у него в ходе длительной эволюции в озере Байкал. Учитывая тот факт, что вид является представителем эволюционно древней филогенетической клады Micruropodidae и, предположительно, реликтом третичного периода, он мог приобрести дополнительные молекулярные и биохимические адаптации к температурным условиям среды. Считается, что древняя фауна, сохранившаяся до сегодняшних дней в озере, переживала эпоху оледенений в рефугиумах, каковыми являются горячие источники (Тахтеев *и* Галимзянова, 2009).

Таким образом, вероятно система БТШ70 *G. fasciatus* претерпела значительные микроэволюционные изменения, что позволяет этому виду демонстрировать высокие показатели толерантности и активно распространяться в новые для него ареалы.

CONCLUSIONS

Проведенное исследование демонстрирует высокую степень эволюционной пластичности семейства БТШ70 у двух наиболее термотолерантных видов байкальских амфипод. Полученные данные указывают на особенности молекулярной эволюции изучаемого генного семейства у амфипод из озера Байкал, связанные с длительной эволюцией. Кроме того, результаты указывают на существенные адаптивные преимущества обоих исследованных видов перед температурно-чувствительными видами, доминирующими в литорали, в свете глобального изменения климата, и на особое положение *G. fasciatus*, позволяющее этому виду осваивать новые ареалы и вытеснять более чувствительные виды.

ACKNOWLEDGEMENT

Авторы выражают благодарность руководителю научно-исследовательской экспедиции, профессору Тахтееву Вадиму Викторовичу, команде научно-исследовательского судна «М.М. Кожов» и лично капитану Вещеву Сергею Николаевичу. Выражаем благодарность всем участникам научно-исследовательской экспедиции, в частности Павличенко Василию Валерьевичу за помощь со сбором и фиксацией амфипод. Настоящее исследование проведено при частичной финансовой поддержке проектов РНФ (17-14-01063), РФФИ (16-34-60060), а также Фонда поддержки прикладных экологических разработок и исследований «Озеро Байкал» и гранта Президента РФ (МК-6804.2018.4).

REFERENCES

Вейнберг, И.В. (1995). Сообщества макрозообентоса каменистого пляжа озера Байкал. Дис. канд. биол. наук. Иркутск. 180 с.

Мордухай-Болтовской, Ф.Д., Чиркова, З.Н. (1971). О распространении байкальского бокоплава *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing) в Горьковском водохранилище. *Биология внутренних вод: Информационный бюллетень*, **(9)**, 38-42.

Нилова, О.И. (1976). Некоторые черты экологии и биологии *Gmelinoides fasciatus* (Stebb.),

акклиматизированных в озере Отрадное Ленинградской области. *Известия ГосНИОРХ,* **110**, 10-15.

Снимщикова, Л.Н. (1977). Бентос Истокского сора. Лимнология прибрежно-соровой зоны Байкала. Новосибирск: Наука, 192-197.

Тахтеев, В.В. (2000). Очерки о бокоплавах озера Байкал: Систематика, сравнительная экология, эволюция. Издательство Иркутского университета.

Тахтеев, В.В., Галимзянова, А.В. (2009). Байкальские родники. *Экология и жизнь*, **3(88)**, 40-45.

Тимофеев, М.А., Кириченко, К.А. (2004). Экспериментальная оценка роли абиотических факторов в ограничении распространения эндемиков за пределы озера Байкал на примере амфипод. *Сибирский экологический журнал*, **11(1)**, 41-50.

Тимофеев, М.А. (2010). Экологические и физиологические аспекты адаптации к абиотическим факторам среды эндемичных байкальских и палеарктических амфипод. Дисс. докт. биол. наук. Иркутск. 384 с.

Черепанов, В.В., Александров, В.Н., Камалтынов, Р.М., Наделяев, И.Н. (1977). Зообентос прибрежно-соровых участков Северного Байкала. Лимнология прибрежно-соровой зоны Байкала. - Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 198-207.

Bedulina, D.S., Evgen'ev, M.B., Timofeyev, M.A., Protopopova, M.V., Garbuz, D.G., Pavlichenko, V.V., Sokolova, I.M. (2013). Expression patterns and organization of the hsp70 genes correlate with thermotolerance in two congener endemic amphipod species (*Eulimnogammarus cyaneus* and *E. verrucosus*) from Lake Baikal. *Mol Ecol*, **22(5)**, 1416-1430.

Bedulina, D.S., Zimmer, M., Timofeyev, M.A. (2010). Sub-littoral and supra-littoral amphipods respond differently to acute thermal stress. *Comp Biochem Physiol B*, **155(4)**, 413-418.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.

Garbuz, D.G., Evgen'ev, M.B. (2017). The evolution of heat shock genes and expression patterns of heat shock proteins in the species from temperature contrasting habitats. *Rus J Genet*, **53(1)**, 21-38.

Evgen'ev, M.B., Zatsepina, O.G., Garbuz, D., Lerman, D.N., Velikodvorskaya, V., Zelentsova, E., Feder, M.E. (2004). Evolution and arrangement of the hsp70 gene cluster in two closely related species of the virilis group of Drosophila. *Chromosoma*, **113(5)**, 223-232.

Hamdoun, A.M., Cheney, D.P., Cherr, G.N. (2003). Phenotypic plasticity of HSP70 and HSP70 gene expression in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): implications for thermal limits and induction of thermal tolerance. *Biol Bul*, **205(2)**, 160-169.

Jakob, L., Axenov-Gribanov, D.V., Gurkov, A.N., Ginzburg, M., Bedulina, D.S., Timofeyev, M.A., Pörtner, H.O. (2016). Lake Baikal amphipods under climate change: thermal constraints and ecological consequences. *Ecosphere*, **7(3)**.

Kozhova, O.M., Izmesteva L.R. (1998) Lake Baikal: Evolution and Biodiversity. Backhuys Publishers. Leiden. 447 p.

Laemmli, U.K. (1970) Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis. *Nature*, **227**, 680-685.

Lindquist, S., Craig, E.A. (1988). The heat-shock

proteins. *Annu Rev Genet*, **22(1)**, 631-677.

Naumenko, S.A., Logacheva, M.D., Popova, N.V., Klepikova, A.V., Penin, A.A., Bazykin, G.A., Yampolsky, L.Y. (2017). Transcriptome-based phylogeny of endemic Lake Baikal amphipod species flock: fast speciation accompanied by frequent episodes of positive selection. *Mol Ecol,* **26(2)**, 536-553.

Papot, C., Cascella, K., Toullec, J.Y., Jollivet, D. (2016). Divergent ecological histories of two sister Antarctic krill species led to contrasted patterns of genetic diversity in their heat-shock protein (hsp70) arsenal. *Ecol Evol*, **6(5)**, 1555-1575.

Panov, V.E., Berezina, N.A. (2002). Invasion history, biology and impacts of the Baikalian amphipod *Gmelinoides fasciatus*. In Invasive Aquatic Species of Europe. Distribution, Impacts and Management. Springer, Dordrecht. (pp. 96-103).

Potemkina, T.G., Potemkin, V.L., Fedotov, A.P. (2018). Climatic factors as risks of recent ecological changes in the shallow zone of Lake Baikal. *Rus Geol Geophys*, **59(5)**, 556-565.

Shatilina, Z.M., Riss, H.W., Protopopova, M.V., Trippe, M., Meyer, E.I., Pavlichenko, V.V., Timofeyev, M.A. (2011). The role of the heat shock proteins (HSP70 and sHSP) in the thermotolerance of freshwater amphipods from contrasting habitats. *J Therm Biol*, **36(2)**, 142-149.

Takhteev, V.V., Berezina, N.A., Sidorov, D.A. (2015). Checklist of the Amphipoda (Crustacea) from continental waters of Russia, with data on alien species. *Arthropoda Selecta*, **24(3)**, 335-370.

Tomanek, L. (2008). The importance of physiological limits in determining biogeographical range shifts due to global climate change: the heat-shock response. *Physiol Biochem Zool,* **81(6)**, 709-717.

Zatsepina, O.G., Ulmasov, K.A., Beresten, S.F., Molodtsov, V.B., Rybtsov, S.A., Evgen'ev, M.B. (2000). Thermotolerant desert lizards characteristically differ in terms of heat-shock system regulation. *J Exp Biol,* **203(6)**, 1017-1025.