

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК**

**Сибирское отделение**

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки**

**Институт цитологии и генетики**

На правах рукописи

Струнов Антон Александрович

**РАСПРЕДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИЙ *WOLBACHIA* ПАТОГЕННОГО  
ШТАММА *wMELPOP* В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ  
*DROSOPHILA MELANOGASTER* И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ  
ЖИЗНИ ХОЗЯИНА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ**

(03.03.04) «клеточная биология, цитология, гистология»

Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Научный руководитель  
в.н.с., к.б.н. Киселёва Е.В.

**Новосибирск, 2014**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	7
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	8
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	15
1.1. Характеристика различных форм симбиоза .....	15
1.2. Бактерии <i>Wolbachia</i> – эндосимбионты членистоногих и нематод .....	17
1.2.1. Ультраструктурная организация бактерий <i>Wolbachia</i> .....	18
1.2.2. Филогения бактерий <i>Wolbachia</i> .....	19
1.2.3. Распределение бактерий <i>Wolbachia</i> в тканях хозяина .....	23
1.2.4. Действие <i>Wolbachia</i> на организм хозяина .....	26
1.2.4.1. Репродуктивные модификации, вызываемые <i>Wolbachia</i> в организме хозяина .....	28
1.2.4.2. Влияние <i>Wolbachia</i> на жизнеспособность хозяина .....	35
1.2.4.3. Влияние бактерий <i>Wolbachia</i> штамма wMelPop на продолжительность жизни <i>D. melanogaster</i> .....	38
1.3. <i>Drosophila</i> – удобный объект для исследования взаимодействия <i>Wolbachia</i> с организмом хозяина .....	39
1.3.1. Строение мозга <i>Drosophila melanogaster</i> .....	40
1.4. Влияние неблагоприятных факторов среды на взаимоотношение эндосимбионта и хозяина .....	42
1.4.1. Действие повышенных и пониженных температур на систему эндосимбионт – хозяин .....	44
1.4.2. Влияние повышенных и пониженных температур на взаимоотношение эндосимбионта и хозяина .....	47

Заключение.....	49
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....</b>	<b>50</b>
2.1. Характеристика использованных в работе лабораторных линий мух, температурные режимы их содержания и схемы популяционных экспериментов..	50
2.2. Список использованных реактивов .....	53
2.3. Молекулярно-биологические методы .....	53
2.3.1. Выделение геномной ДНК из дрозофилы.....	53
2.3.2. Условия полимеразной цепной реакции для определения наличия бактерий в организме <i>D. melanogaster</i> .....	54
2.3.3. Электрофорез ДНК в агарозном геле .....	55
2.3.4. Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля и определение их нуклеотидной последовательности.....	55
2.4. Электронная микроскопия.....	56
2.4.1. Фиксация и заливка образцов мозга <i>D. melanogaster</i> для электронной микроскопии.....	56
2.4.2. Получение, окрашивание и исследование полутонких и ультратонких срезов .....	58
2.5. Конфокальная микроскопия .....	58
2.5.1. Фиксация и флуоресцентная гибридизация <i>in situ</i> образцов мозга <i>D. melanogaster</i> .....	58
2.5.2. Подсчёт относительной плотности и количества бактерий <i>Wolbachia</i> в клетках мозга <i>D. melanogaster</i> с помощью программы ImageJ.....	60
2.5.2.1. Измерение плотности бактерий относительно всей площади мозга .....	60
2.5.2.2. Измерение количества бактерий в единичной клетке мозга .....	61

2.6. Статистические методы .....	61
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ .....</b>	<b>63</b>
3.1. Молекулярно-биологический анализ инфицированности линий <i>w1118</i> и <i>w1118T D. melanogaster</i> бактериями <i>Wolbachia</i> штамма <i>wMelPop</i> .....	63
3.2. Популяционный анализ продолжительности жизни и выживаемости линии <i>D. melanogaster</i> , не инфицированной и инфицированной <i>Wolbachia</i> штамма <i>wMelPop</i> при различных температурных режимах .....	64
3.2.1. Сравнительный анализ средней продолжительности жизни и выживаемости инфицированной и не инфицированной <i>Wolbachia</i> штамма <i>wMelPop</i> линий <i>D. melanogaster</i> , содержащихся постоянно при 25 °С, 29 °С и 16 °С.....	64
3.2.2. Сравнительный анализ средней продолжительности жизни и выживаемости инфицированной и не инфицированной <i>Wolbachia</i> штамма <i>wMelPop</i> линии <i>D. melanogaster</i> , при содержании мух в течение 3, 7 и 13 суток при повышенной температуре (29 °С) и последующем их переносе на пониженную температуру (16 °С).....	66
3.3. Исследование структурной организации и распределения симбиотических бактерий <i>Wolbachia</i> в клетках мозга <i>D. melanogaster</i> при различных температурных режимах с помощью электронной микроскопии .....	69
3.3.1. Морфология клеток мозга самок <i>D. melanogaster</i> .....	69
3.3.2. Ультраструктура и распределение <i>Wolbachia</i> в клетках мозга самок <i>D. melanogaster</i> , содержащихся при 25 °С .....	72
3.3.3. Ультраструктура и распределение <i>Wolbachia</i> в ткани мозга самок <i>D. melanogaster</i> , содержащихся при повышенной температуре (29 °С) .....	73

3.3.4. Исследование ультраструктуры и распределения <i>Wolbachia</i> в ткани мозга <i>D. melanogaster</i> при пониженной температуре (16 °C).....	74
3.3.5. Распределение <i>Wolbachia</i> в клетках мозга <i>D. melanogaster</i> при содержании мух на повышенной температуре (29 °C) и последующем их переносе на пониженную (16 °C) температуру.....	75
3.3.6. Гетерогенность морфологических типов бактерий и частота их встречаемости в клетках мозга мух, содержащихся при различных температурных режимах.....	77
3.4. Распределение симбиотических бактерий <i>Wolbachia</i> в клетках мозга <i>D. melanogaster</i> на разных стадиях жизненного цикла при 25 °C и 29 °C, исследованное с помощью конфокальной микроскопии .....	80
3.4.1. Детекция <i>Wolbachia</i> штамма wMelPop в клетках центральной нервной системы <i>D. melanogaster</i> .....	80
3.4.2. Распределение и титр бактерий <i>Wolbachia</i> в клетках центральной нервной системы личинок 3-го возраста <i>D. melanogaster</i> при 25 °C и 29 °C .....	81
3.4.3. Распределение и титр бактерий <i>Wolbachia</i> в клетках мозга взрослых мух при 25 °C и 29 °C.....	83
3.4.4. Сравнительный анализ плотности <i>Wolbachia</i> в центральной нервной системе личинок 3-го возраста и мозга взрослых мух, содержащихся при 25 °C и 29 °C на основании данных флуоресцентной гибридизации <i>in situ</i> .....	85
3.4.5. Сравнительный анализ плотности <i>Wolbachia</i> в клетках мозга куколок <i>D. melanogaster</i> , содержащихся при 25 °C и 29 °C на основании данных флуоресцентной гибридизации <i>in situ</i> .....	87
<b>ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>89</b>

4.1. Особенности взаимоотношений внутри ассоциации <i>Wolbachia-D. melanogaster</i> в условиях повышенной и пониженной температуры .....	89
4.1.1. Влияние повышенной и пониженной температуры на организм <i>D. melanogaster</i> .....	89
4.1.2. Влияние повышенной и пониженной температуры на жизнеспособность <i>Wolbachia</i> .....	93
4.1.3. Влияние повышенной и пониженной температуры на взаимодействие партнеров в симбиотической системе <i>Wolbachia-D. melanogaster</i> .....	96
4.2. Возможные пути деградации бактерий <i>Wolbachia</i> штамма wMelPop в клетках мозга <i>D. melanogaster</i> . Гибель бактерий как один из главных факторов, снижающих продолжительность жизни <i>D. melanogaster</i> .....	98
4.3. Влияние повышенной температуры на титр бактерий <i>Wolbachia</i> в клетках мозга <i>D. melanogaster</i> проявляется начиная со стадии «поздней» куколки .....	102
4.4. Особенности распределения <i>Wolbachia</i> штамма wMelPop на разных стадиях жизненного цикла <i>D. melanogaster</i> .....	104
Заключение .....	110
<b>ВЫВОДЫ</b> .....	111
<b>ЛИТЕРАТУРА</b> .....	113
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ</b> .....	137

**СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ**

БНС – брюшной нервный ствол;

ЗОД – зачатки оптических долей;

ПЖ – продолжительность жизни;

ПГ – подглоточный ганглий;

ЦН – цитоплазматическая несовместимость;

ЦНС – центральная нервная система;

ЭПР – эндоплазматический ретикулум;

HSPs – белки теплового шока (heat shock protein).

## ВВЕДЕНИЕ

Явление симбиоза широко распространено в биологических системах. В настоящее время изучению сосуществования и взаимодействия организмов уделяется большое внимание. Одним из главных успехов в исследовании симбиотических взаимоотношений стало доказательство симбиотического происхождения эукариот (Маргулис, 1983). Показано, что симбионты оказывают различное влияние на жизнедеятельность хозяина и могут играть ключевую роль в его развитии. Механизмы этих сложившихся в эволюции тесных взаимоотношений до сих пор полностью не раскрыты, в частности, почти не изучен вопрос о действии неблагоприятных условий среды на систему симбионт-хозяин. В рамках исследований проводятся эксперименты, которые моделируют воздействие различных абиотических факторов на организмы. Известно, что эффективность симбиоза зависит от генотипов организмов и условий их обитания (Thomas, Blanford, 2003). Как хозяин, так и симбионт могут специфически реагировать на изменения окружающей среды, а реакция симбиотической ассоциации в целом зависит от тесного взаимодействия партнёров в новых условиях. Исследование взаимоотношений симбионта и хозяина, характера их ответа на воздействия различных факторов в искусственно созданных стрессовых условиях содержания является одним из подходов для выяснения тонких механизмов взаимодействия симбиотических партнёров в тесной ассоциации.



Эндосимбиоз, при котором один из симбионтов может существовать только внутри другого, является примером высокой адаптации организмов. Ярким представителем таких взаимоотношений являются бактерии *Wolbachia*, обнаруженные у многих членистоногих и нематод. Эти внутриклеточные симбионты привлекли внимание учёных в виду своего широкого распространения среди насекомых, а также разнообразного влияния на их развитие и жизнеспособность. *Wolbachia* способны влиять на репродуктивные свойства хозяина, вызывая цитоплазматическую несовместимость (ЦН), партеногенез, гибель самцов или феминизацию (Stouthamer *et al.*, 1999; Serbus *et al.*, 2008). Исследование механизмов влияния *Wolbachia* на организм хозяина относится к актуальным проблемам биологии и имеет важное прикладное значение, поскольку эти бактерии могут быть использованы в будущем для борьбы с переносчиками различных заболеваний человека, таких как малярия или лихорадка Денге, а также с вредителями сельского хозяйства. Например, недавно было продемонстрировано успешное внедрение инфицированных *Wolbachia* комаров *Aedes aegypti* в природную популяцию этих переносчиков лихорадки Денге на территории Австралии, что привело к снижению частоты передачи вирусной инфекции людям (Hoffman *et al.*, 2011). Недавно была получена стабильная инфицированная *Wolbachia* линия комаров *Anopheles stephensi*, которые являются одними из главных переносчиков малярии у людей, что в будущем позволит разработать безвредное для окружающей среды и эффективное средство для борьбы с этими насекомыми (Bian *et al.*, 2013).

Установлено, что некоторые штаммы *Wolbachia* могут влиять на жизнеспособность партнёра, снижая или повышая его плодовитость, выживаемость

и продолжительность жизни (ПЖ). Одним из таких штаммов является wMelPop, который, помимо репродуктивных тканей, обнаруживается в мышцах, сетчатке и клетках мозга *Drosophila melanogaster*, которая является удобным объектом для изучения особенностей поведения *Wolbachia*. Американскими учёными впервые было показано, что *Wolbachia* штамма wMelPop значительно снижает ПЖ заражённых им мух (Min, Benzer, 1997). Авторы установили, что у мух, содержащихся при повышенной температуре (29 °C) этот негативный эффект увеличивается в два раза по сравнению с насекомыми, содержащимися при нормальной температуре (25 °C). Интересно, что, согласно последним исследованиям, пониженная температура (16 °C) способствует восстановлению ПЖ у заражённых мух до уровня неинфицированных особей (Вайсман, 2009), однако механизм этого явления во многом ещё не ясен. Одним из подходов для выяснения причин описанных изменений ПЖ инфицированных мух может служить детальный анализ организации, распределения и взаимодействия *Wolbachia* и её хозяина в различных стрессовых условиях, в нашем случае при повышенной и пониженной температуре, с использованием методов просвечивающей электронной микроскопии и флуоресцентной гибридизации *in situ*.

Целью настоящей работы было исследование влияния *Wolbachia* штамма wMelPop на продолжительность жизни и выживаемость *D. melanogaster*, распределение и ультраструктуру бактерий в клетках мозга хозяина на последовательных стадиях его жизненного цикла при различных температурах. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Сравнить ПЖ и выживаемость инфицированных и не инфицированных *Wolbachia D. melanogaster* при разных температурных режимах: I - постоянное

содержание мух при 25 °С и 29 °С; II – содержание мух при 29° С в течение 3, 7 и 13 дней и последующий их перенос на 16 °С; постоянное содержание мух при 16 °С;

2. Исследовать строение клеток мозга *D. melanogaster*, ультраструктуру и локализацию *Wolbachia* в этих клетках при температурных режимах I;

3. Провести анализ ультраструктурной организации бактерий и их распределения в клетках мозга *D. melanogaster*, содержащихся в условиях температурных режимов II;

4. Исследовать распределение бактерий и оценить их титр в различных отделах мозга *D. melanogaster* на последовательных стадиях их жизненного цикла (личинка 3-го возраста, куколка и взрослая муха) при температурных режимах I.

Научная новизна работы. С помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* впервые проведено подробное исследование распределения бактерий *Wolbachia* в клетках мозга насекомого *Drosophila melanogaster* на разных стадиях развития хозяина при умеренной и повышенной температурах. Впервые на ультраструктурном уровне проведено детальное описание распределения морфологии бактерий в различных клетках мозга насекомого. Благодаря комплексному подходу (сочетанию популяционных методов и электронной микроскопии) нами определен критический период воздействия повышенной температуры, вызывающий накопление бактерий и преждевременную гибель хозяина. Впервые предложена схема последовательных стадий деградации бактерий под действием температуры. Выявлено, что повышенная температура не оказывает влияния на титр бактерий в центральной нервной системе насекомого на стадии личинки, а также ранней и средней куколки, однако увеличивает его, начиная со стадии поздней куколки и после вылета имаго. Специфический характер распределения бактерий в мозге насекомого

закладывается в раннем эмбриогенезе путём неравномерного распределения эндосимбионтов при формировании первичных нейронов центральной нервной системы (ЦНС) хозяина.

Теоретическая и практическая значимость. Подробное описание распределения бактерий в клетках различных отделов мозга мух, проведенное в данной работе, обладает важной теоретической значимостью для будущих работ, связанных с изучением влияния бактерий на поведение их хозяев. В настоящее время многие лаборатории по всему миру активно занимаются этой темой. Данные по влиянию повышенной и пониженной температуры на жизнедеятельность микроорганизмов важны для практического применения бактерий *Wolbachia* в качестве биологического оружия в борьбе с насекомыми-вредителями сельского хозяйства, а также различными переносчиками заболеваний человека. Воздействие окружающей среды значительно сказывается на взаимоотношениях в системе эндосимбионт-хозяин, поэтому изучение влияния стрессовых факторов на симбиотическую ассоциацию является необходимым звеном, при планировании полевых экспериментов.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на: 14-й Международной Пушинской школе-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века» (Пушино, Россия, 2010); 23-й Российской конференции по электронной микроскопии (Черноголовка, Россия, 2010); 48-й Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, Россия, 2010); 15-й Международной Пушинской школе-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века» (Пушино, Россия, 2011); Международной конференции «Проблемы популяционной и общей генетики»

(Москва, Россия, 2011); отчетной конференции программы фундаментальных исследований Президиума РАН. “Биологическое разнообразие”. Подпрограмма “Генофонды и генетическое разнообразие” (Москва, Россия, 2011); 24-й Российской конференции по электронной микроскопии (Черноголовка, Россия, 2012); 7-й Международной конференции, посвященной биологии *Wolbachia* и саммите Европейской организации по кооперации в науке и технологии (EU COST) FA0701 (остров Олерон, Франция, 2012); на отчетной сессии Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия, 2012); 13-м Европейском саммите по вкусу и обонянию у насекомых (Вилазимиус, Италия, 2013).

Основные публикации:

1. **Strunov, A.**, Kiseleva, E., Gottlieb, Y. Spatial and temporal distribution of pathogenic *Wolbachia* strain *wMelPop* in *Drosophila melanogaster* central nervous system under different temperature conditions // Journal of Invertebrate Pathology. 2013. V. 114. P. 22-30.
2. **Струнов, А.А.**, Илинский, Ю.Ю., Захаров, И.К., Киселева, Е.В. Влияние повышенной температуры на выживаемость *Drosophila melanogaster*, индуцированных патогенным штаммом бактерий *Wolbachia* // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т. 17. № 2. С. 267-276.  
  
**Strunov, A. A.**, Ilinskii, Yu. Yu., Zakharov, I. K., Kiseleva, E. V. Effect of high temperature on survival of *Drosophila melanogaster* infected with pathogenic strain of *Wolbachia* bacteria // Russian Journal of Genetics: Applied Research. 2013. V. 3. No. 6. – P. 435-443.
3. Жукова, М.В., **Струнов, А.А.**, Малькеева, Д.А., Киселева, Е.В. Заражай и властвуй! // Наука из первых рук. 2014. Т. 55. №1. С. 79-87.

Структура и объём диссертации. Диссертационная работа состоит из оглавления, списка сокращений, введения, обзора литературы, описания используемых материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы. Работа изложена на 186 страницах, содержит 54 рисунка и 6 таблиц. Библиографический указатель литературы включает 196 источников, из них 13 отечественных и 183 зарубежных.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность сотрудникам лаборатории морфологии и функции клеточных структур ИЦиГ СО РАН, отдела биологии клетки и лично научному руководителю Киселевой Е.В., а также Морозовой К.Н. и Жуковой М.В. за помощь, оказанную на всех этапах выполнения работы. Автор благодарит Илинского Ю.Ю. и Захарова И.К. (лаборатория генетики популяций, ИЦиГ СО РАН) за помощь в проведении популяционных экспериментов и поддержании лабораторных линий мух. Кроме того, автор выражает благодарность зав. лабораторией Рубцову Н.Б. и зав. ЦКП Байбородину С.И. за создание и возможность использования замечательного ЦКП микроскопического анализа биологических объектов в ИЦиГ СО РАН, а также Высоцкой Л.В. и Омельянчуку Л.В. за ценные критические замечания и советы по написанию диссертации.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Характеристика различных форм симбиоза

Симбиоз (от греческого  $\sigma\upsilon\mu$  – «совместно» и  $\beta\acute{\iota}\omicron\varsigma$  — «жизнь») – это взаимодействие и сосуществование представителей разных биологических видов (Wernegreen, 2004). Симбиотические ассоциации между микроорганизмами и высшими эукариотами встречаются довольно часто и включают мутуалистические (взаимовыгодные), нейтральные и паразитические (вредные) отношения (Wetren, 1997). Для двух видов возможно шесть попарных пересечений этих эффектов, которые отражены в таблице 1.

Таблица 1. Типы симбиоза (взято из Бухарин, Усвяцов, 1996).

Типы симбиоза		Вид А		
		+	0	-
Вид Б	+	Мутуализм	Комменсализм	Паразитизм
	0	Комменсализм	Нейтрализм	Аменсализм
	-	Паразитизм	Аменсализм	Конкуренция

«+» - приносящий пользу сожителю, «-» - приносящий вред сожителю,

«0» - нет влияния на сожителя.

Мутуализм — это симбиотические взаимоотношения, когда оба сожительствующих вида извлекают взаимную пользу. Комменсализмом (дословно - "питание вместе за одним столом") называют взаимоотношения видов, при которых один из партнеров получает пользу, не нанося ущерб другому. Паразитизмом является форма взаимоотношений между видами, при которой организмы одного вида (паразита, потребителя) живут за счет питательных веществ или тканей организма другого вида (хозяина) в течение определённого времени. Нейтрализм представляет собой отношения, при которых оба вида независимы и не оказывают друг на друга никакого влияния. Амменсализм — это тип межвидовых взаимоотношений, при котором в совместной среде обитания один вид подавляет существование другого вида, не испытывая противодействия. При конкуренции виды соперничают между собой в поисках пищи, укрытия, мест кладки яиц и т. п.

Одной из разновидностей симбиоза является эндосимбиоз, при котором один из организмов живёт внутри тела другого (хозяина), вступая с ним в очень тесный контакт. Одним из ярких и интересных примеров такого сожительства является простейшее жгутиконосец *Mixotricha paradoxa*, обитающее в кишечнике австралийского термита *Mastotermes darwinensis* (Маргулис, 1983). Внутри простейшего живёт четыре типа бактерий. Для движения *Mixotricha paradoxa* использует более 250 000 бактерий *Treponema spirochetes*, а также 200 более крупных, имеющих вытянутую, спиралевидную форму, *Canaleparolina darwiniensis*, которые прикреплены к поверхности протиста. Будучи вторично лишённым митохондрий, жгутиконосец содержит внутри себя сферические аэробные бактерии, заменяющие собой отсутствующую органеллу (Margulis, Sagan, 2001). На поверхности жгутиконосца обнаружены также палочковидные бактерии, функция



которых до сих пор не выяснена.

Общепринято считать, что очень важные органеллы нашей клетки, митохондрии, возникли в результате тесного симбиоза бактерии и эукариотической клетки (Gray, Doolittle, 1982; Gabaldon, Huynen, 2007; Agnati *et al.*, 2009). Аналогичное происхождение рассматривают и для пластид (Martin, Kovalik, 1999; Howe *et al.*, 2008). Предполагается, что около двух миллиардов лет назад одноклеточная анаэробная жизненная форма была захвачена риккетсия-подобным организмом, который через несколько поколений получил возможность поглощать кислород (Fox, 2004). В процессе жизнедеятельности этого организма бактерия потеряла многие функции и превратилась во внутриклеточную органеллу. Об этом говорит теория эндосимбиотического происхождения, утверждающая, что эукариотическая клетка с самого начала произошла из кооперации свободно живущих микробов, образовавших между собой сложное сообщество и прочно закрепившихся в качестве внутриклеточных органелл.

Широкое распределение внутриклеточных паразитов среди большого разнообразия хозяев и их множественное влияние на организм доказывают огромную роль эндосимбиоза в эволюции. Микробные симбионты сильно повлияли на развитие сложно устроенных организмов (Wernegreen, 2004). Симбиоз является важнейшим двигателем эволюции и экологического разнообразия.

## **1.2. Бактерии *Wolbachia* – эндосимбионты членистоногих и нематод**

Неизвестная внутриклеточная бактерия была впервые обнаружена в репродуктивных тканях комаров *Culex pipiens* Гертигом и Вольбахом (Hertig, Wolbach, 1924). В 1936 г. ей было дано официальное название *Wolbachia pipientis* (Hertig, 1936). В 50-х годах Гелелович и Лавен (Ghelelovitch, Laven, 1951)

обнаружили нежизнеспособность потомков межрасовых скрещиваний комаров комплекса видов *C. pipiens*. Это явление было названо цитоплазматической несовместимостью (ЦН), а в 70-х годах была найдена взаимосвязь этих двух важных факторов, после того, как было показано, что ЦН проявляется в присутствии *Wolbachia* в организме хозяина (Yen, Barr, 1971; Werren, 1997). С этого времени начались активные исследования эндосимбиотических бактерий *Wolbachia*. Согласно последним оценкам, бактерия обнаружена более чем у половины всего видового разнообразия насекомых (Hilgenboecker *et al.*, 2008). Показано также, что 40 % наземных артропод инфицированы *Wolbachia* (Zug, Hammerstein, 2012). Эти эндосимбионты выявляются у 16 видов нематод (Taylor *et al.*, 2000), некоторых многоножек и клещей. Помимо репродуктивных органов *Wolbachia* обнаруживаются также в клетках соматических тканей: жирового тела, мальпигиевых сосудов, кишечника, нервной системы, слюнных желез и имагинальных дисков (Glover *et al.*, 1990; Dobson *et al.*, 1999; Clark *et al.*, 2005; Saridaki, Bourtzis, 2010). Следует отметить, что наряду с инфицированными клетками в ткани хозяина могут присутствовать и неинфицированные клетки, т.е. распространенность бактерий в соматических тканях имеет мозаичный характер (Clark *et al.*, 2005).

### **1.2.1. Ультраструктурная организация бактерий *Wolbachia***

*Wolbachia* относятся к грамотрицательным бактериям, которые имеют основные признаки риккетсия-подобных организмов. Её клетки полиморфны: это либо очень мелкие коккоидные формы (0,25 – 1 мкм) или неправильные палочковидные (0,5 – 1,3 мкм), либо очень крупные палочки (1 – 1,8 мкм) (Горячева, 2004). Показано, что одновременно с возрастом хозяйской клетки повышается и

уровень плейоморфности бактерий (Stouthamer *et al.*, 1999). Оболочка бактерии представлена тремя мембранами: внешняя, предположительно, имеет хозяйское, а остальные две – бактериальное происхождение (Stouthamer *et al.*, 1999). В матриксе бактерий выявляется большое количество рибосом, а также расплавленные нити ДНК и компактный хроматин. В тканях многих организмов (у некоторых видов *Drosophila*, нематод, комара *Culex quinquefasciata*) *Wolbachia* встречаются в виде кластеров из 3-8 бактерий (Taylor *et al.*, 2000; Townson, 2002; Дудкина и др., 2004).

*Wolbachia* может инфицировать у одних видов только самок, а у других видов – особей обоих полов, причем численность её в одном хозяине значительно различается у разных видов. В зараженных самках мокрицы *Armadillidium vulgare* находится 66000-164000 бактерий (Горячева, 2004), в яйцах мелкой паразитической осы рода *Trichogramma* - 250-670 бактерий, в яйцах разных видов *Drosophila* по разным данным от 2600-18000 до 500000 бактерий. Численность бактериальных клеток в инфицированных самцах *Drosophila* оценивается как  $36.5 \times 10^6$  (Boyle *et al.*, 1993).

### 1.2.2. Филогения бактерий *Wolbachia*

*Wolbachia pipientis* является единственным видом рода *Wolbachia* (семейство Anaplasmataceae, порядок Rickettsiales, класс  $\alpha$ -proteobacteria) (Dumler *et al.*, 2001). Два других вида *W. persica* (эндосимбионт клещей) и *W. melophagi* (паразит бескрылых кровососущих мух), изначально отнесённые к этому же роду, спустя некоторое время были исключены из него (Dumler *et al.*, 2001). *W. pipientis* наиболее близка риккетсия-подобным бактериям *Anaplasma* (Рис. 1) - патогенам млекопитающих, переносимых членистоногими (O'Neill *et al.*, 1992).

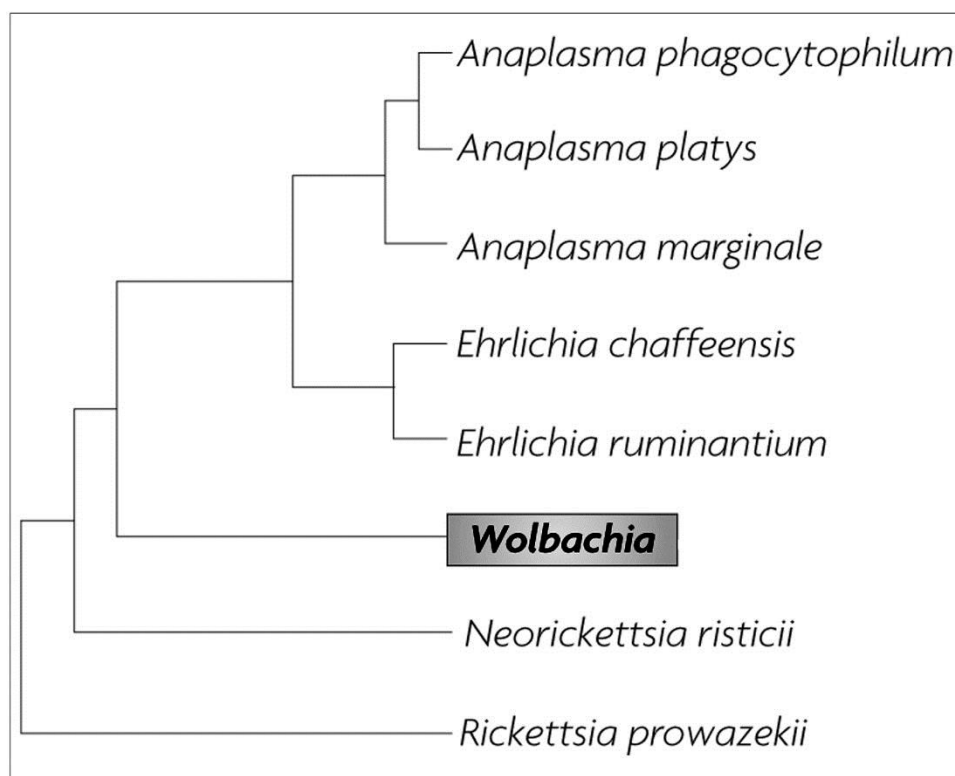


Рис. 1. Филогенетическое дерево, демонстрирующее эволюционное положение *Wolbachia* среди основных представителей симбиотических бактерий (из Werren *et al.*, 2008).

Облигатный внутриклеточный паразитизм накладывает определенные ограничения на размер генома бактерии. Размер генома *Wolbachia* - 0,95-1,66 Мб (Sun, O'Neill, 2001) сходен с таковым у других внутриклеточных прокариот порядка Rickettsiales. Для облигатно существующих внутриклеточных бактерий характерна тенденция к утрате значительной части генома, поскольку есть возможность пользоваться ресурсами клетки хозяина. Например, у свободноживущей кишечной палочки *Escherichia coli* геном имеет размер 4,6 Мб, у *Rickettsia prowazekii* - 1,11 Мб, а у облигатных мутуалистов *Buchnera aphidicola* - 0,6 Мб. Самый маленький геном среди всех бактерий обнаружен у *Carsonella*, найденной у листоблошек. Его размер составляет всего 160 Кб (Dale *et al.*, 2005).

Род *Wolbachia* имеет большое генетическое разнообразие и подразделяется на одиннадцать супергрупп (А - J) (Lo *et al.*, 2007; Ros *et al.*, 2009). В настоящее время считается, что все они представляют единственный вид *Wolbachia pipientis*. Супергруппы «А» и «В» являются наиболее распространенными и, как правило, обнаруживаются среди артропод (клещи, насекомые, ракообразные). Для супергрупп «С» и «D» носителями бактерий являются филярии – паразитические нематоды, возбудители тропического филяриоза. После описания этих четырёх супергрупп количество изученных хозяев, инфицированных *Wolbachia*, постепенно росло, и увеличивалась точность их определения (в исследование обязательно входило множество видов хозяев, и анализировался набор генов), что привело к открытию новых штаммов бактерий *Wolbachia* и новых видов хозяев. Например, супергруппа «F», обнаруженная у нематод и у нескольких основных представителей артропод (ракообразные, скорпионы), была описана в 2002 году и продолжает пополняться новыми штаммами (Baldo *et al.*, 2006). Супергруппы «Е» и «Н» менее разнообразны по своим хозяевам: ногохвостки *Folsomia candida* несут супергруппу «Е» и один род термитов содержит бактерии супергруппы «Н». Штаммы *Wolbachia*, обнаруженные в австралийских пауках (Araneae), были отнесены к супергруппе «G» (Rowley *et al.*, 2004), хотя впоследствии обнаружили, что эти бактерии являются рекомбинантами супергрупп «А» и «В», то есть не имеют монофилетического происхождения (Baldo *et al.*, 2007). Недавно были предложены три новые супергруппы «I», «J» и «K» (Ros *et al.*, 2009). Супергруппа «K» выявлена у клещика паутиного рода *Bryobia* (Tetranychidae). Супергруппы I и J составляют штаммы, найденные соответственно у блох (Siphonaptera) и филярий *D. gracile* (Spirurida). Основные супергруппы *Wolbachia* представлены на рисунке 2.

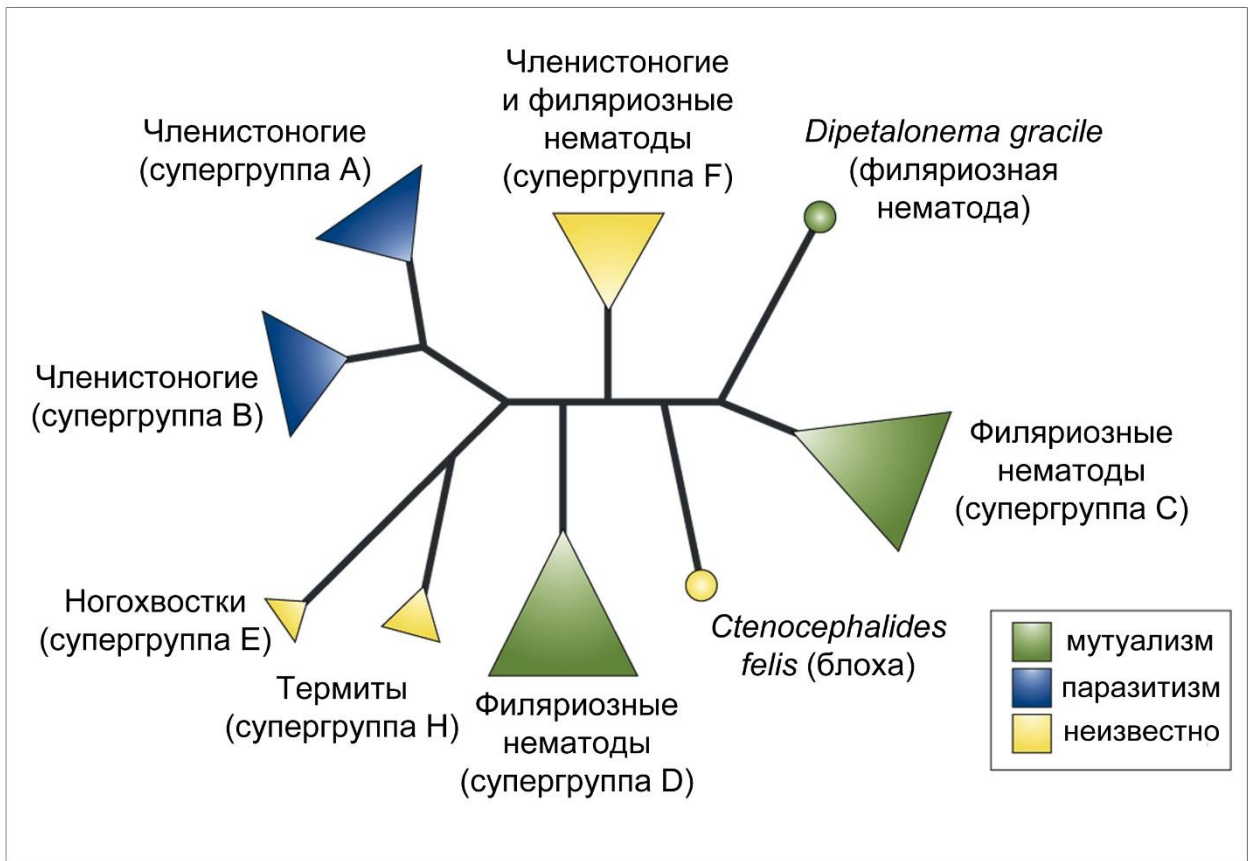


Рис. 2. Некорневое филогенетическое древо основных супергрупп *Wolbachia* с характеристикой взаимоотношений симбионта и хозяина. Для некоторых супергрупп, влияние *Wolbachia* еще не было определено (из Werren *et al.*, 2008).

Предполагается, что дивергенция супергрупп «А-В» и «С-Д» произошла у *Wolbachia* приблизительно 100 миллионов лет назад (Werren *et al.*, 1995). Поскольку нематоды и членистоногие разделились более 600 млн. лет назад, то около 100 млн. лет назад либо имела место горизонтальная передача бактерии между этими группами, либо те и другие получили эндосимбионта от какого-то третьего организма. Маловероятно, что *Wolbachia* появилась в это время от свободноживущей формы, поскольку группа бактерий, к которой она относится, приобрела способность к внутриклеточному существованию более 100 млн. лет назад. Время дивергенции групп «А» и «В» оценивается исследователями в 60 млн.

лет. Предполагается, что между группами «А» и «В» происходила рекомбинация, в результате которой появилась А-подобная супергруппа «G» (Werren *et al.*, 1995).

Было установлено, что супергруппы «А» и «В» инфицируют, как правило, виды одного рода, при этом описаны случаи заражения одной особи сразу двумя отличными друг от друга бактериями (Werren *et al.*, 1995), что как раз способствует возможной рекомбинации между ними (Baldo *et al.*, 2007). В отличие от «А» и «В», остальные супергруппы очень редко инфицируют одного и того же хозяина. Уровень разнообразия в каждой супергруппе сильно варьирует, например, супергруппа «С» содержит сильно отличающиеся друг от друга виды хозяев. Различия между супергруппами, существующими в настоящее время, хорошо подтверждены и похожи больше на внутривидовое разнообразие, чем на межвидовое. Подобным образом недавно описаны супергруппы «I», «J» и «K», которые заметно отличаются от остальных супергрупп, что доказано с помощью мультигенного анализа (Ros *et al.*, 2009).

Результаты филогенетических исследований и отсутствие параллелизма между филогенией хозяина и симбионта свидетельствуют об интенсивном межвидовом горизонтальном переносе *Wolbachia*, который происходит в последние 2,5 млн. лет, но сведения о способах и направлениях такого переноса до сих пор остаются весьма отрывочными.

### **1.2.3. Распределение бактерий *Wolbachia* в тканях хозяина**

Поскольку *Wolbachia* передаются из поколения в поколение трансвариально, основной тканью, в которой обнаруживаются эти эндосимбиотические бактерии, являются яичники хозяина. Помимо женских репродуктивных органов, бактерии также обнаруживаются в клетках мозга, семенников, пищеварительной системы,

жировых тел, Мальпигиевых сосудов, слюнных желез, мышц, сетчатки и в хемоцитах (Saridaki, Bourtzis, 2010). Инфекция всех вышеперечисленных соматических тканей не способствует передаче *Wolbachia* в следующее поколение, и её развитие, по сути, является «тупиковым» для бактерий. Однако существуют гипотезы, объясняющие причину локализации бактерий в этих тканях.

### *Wolbachia* в мозге

Последние исследования распределения бактерий *Wolbachia* в клетках мозга *Drosophila melanogaster* и *Drosophila simulans* дают все основания полагать, что инфекция ЦНС хозяина является неслучайной и обязательной для эндосимбионтов (Albertson *et al.* 2009; Albertson *et al.*, 2013; Strunov *et al.*, 2013). Картина распределения бактерий зависит от штамма *Wolbachia* и вида хозяина. Например, характерной чертой патогенного штамма *Wolbachia* wMelPop является образование крупных скоплений бактерий в клетках мозга *D. melanogaster* и *D. simulans*, которые часто разрывают оболочки клеток и выходят в межклеточное пространство, при этом количество инфицированных клеток остаётся небольшим (Albertson *et al.*, 2013). Штамм wRi, напротив, не создаёт крупных скоплений в клетках мозга аналогичных хозяев, но при этом инфицирует большее количество нейронов и клеток глии по сравнению с wMelPop. Предполагают, что локализация бактерий в специфических областях мозга может влиять на поведение хозяина (Albertson *et al.*, 2009). Было также показано, что *Wolbachia* может воздействовать на обоняние в процессе перемещения насекомого (Peng *et al.*, 2008) и брачные игры (Koukou *et al.*, 2006; Gazla, Carraceda, 2009). Наибольший титр бактерий был выявлен в центральном мозге *Drosophila*, где содержатся важные центры контроля полёта, визуальной памяти, ухаживания и пения (Hanesch *et al.*, 1989; Zars *et al.*, 2000). Специфическая



локализация *Wolbachia* в этих центрах мозга мух, вероятно, приводит к такому поведению насекомого, которое увеличивает шанс передачи инфекции в последующее поколение. Было показано, что мухи разных подвидов *D. paulistorum*, инфицированных разными штаммами *Wolbachia* легко распознают «своих» и «чужих», исключая возможность двунаправленной ЦН и обеспечивая передачу инфекции в следующее поколение (Miller *et al.*, 2010). Искусственное подавление титра бактерий в этих подвидах приводит к резкому увеличению частоты случайных скрещиваний и гибели потомства.

#### *Wolbachia в Мальпигиевых сосудах*

Помимо мозга и репродуктивных тканей Мальпигиевы сосуды являются тканью, которая сохраняется во время метаморфоза (Tapadia, Shukla, 2011). В клетках Мальпигиевых сосудов различных насекомых было обнаружено большое количество *Wolbachia*. Считается, что бактерии в этих тканях представляют вторичный пул *Wolbachia*, необходимый для усиления влияния инфекции на организм хозяина (Faria, Sucena, 2013). Эндосимбионты могут достигать репродуктивных органов насекомого и поддерживать уровень инфекции, перемещаясь по тканям из Мальпигиевых сосудов. Известно, что внесение *Wolbachia* в неинфицированную самку с помощью микроинъекции может вызывать заселение бактериями яичника *de novo* (Frydman *et al.*, 2006). Таким образом, можно считать, что инфекция Мальпигиевых сосудов не является «тупиковой».

#### *Wolbachia в жировых телах*

Жировое тело *Drosophila* отвечает за питание насекомого и регулирует его общий рост (Colombani *et al.*, 2003). Жировое тело играет также важную роль в брачных играх, поскольку отвечает за продукцию феромонов самок и самцов,

необходимых для распознавания «своего» вида (Koukou *et al.*, 2006; Lazareva *et al.*, 2007). *Wolbachia* были выявлены в клетках жировых тел *D. melanogaster* (Clark *et al.*, 2005). Их присутствие может влиять на экспрессию или перцепцию феромонов хозяина, затрагивая, таким образом, напрямую процесс распознавания партнёров во время брачных игр (Koukou *et al.*, 2006).

#### *Wolbachia* в гемоцитах

Показано, что *Wolbachia* присутствуют в гемолимфе насекомых и могут непосредственно влиять на гуморальный иммунный ответ хозяина (Dobson *et al.*, 1999; Haselkorn, 2010). Управление иммунной системой хозяина открывает много возможностей для сохранения и продвижения инфекции *Wolbachia* в последующих поколениях. Подробно о влиянии *Wolbachia* на иммунитет хозяина написано ниже в разделе 1.2.4.2.

#### **1.2.4. Действие *Wolbachia* на организм хозяина**

Способность *Wolbachia* влиять на репродуктивную систему хозяина является успешной эволюционной стратегией, идущей против условно признанного правила, что тесно взаимодействующие организмы эволюционируют в направлении мутуалистических отношений. Открытие штамма *Wolbachia*, инфицирующего филлярий, продемонстрировало способность эндосимбионта выступать в роли условного мутуалиста, поскольку было установлено, что удаление бактерий нарушает в этом случае развитие, линьку и плодовитость хозяина (Bandi, Sacchi, 1999). Таким образом, *Wolbachia* помимо репродуктивных модификаций может влиять на хозяина и в других направлениях. Одним из примеров является паразитирующая оса *Asobara tabida*, у которой недавно обнаружили, что продукция ооцитов и их развитие находится в зависимости от присутствия бактерии (Dedeine *et*

*al.*, 2001). Самки, освобождённые от эндосимбионта тетрациклином, не могли давать потомство, поскольку ооциты погибали в яичнике, не достигая зрелости (Dedeine *et al.*, 2001). Предполагается, что *Wolbachia* влияет на процессы апоптоза, предотвращая гибель питающих клеток и способствуя развитию ооцита (Pannebakker *et al.*, 2007). Влияние бактерии на процесс оогенеза хозяина было также продемонстрировано на *Drosophila*. Например, показано, что *Wolbachia* штамма *wMelPop* увеличивают частоту апоптоза в клетках зародышевой линии *D. melanogaster* (Zhukova, Kiseleva, 2012). Было также выявлено, что присутствие *Wolbachia* в организме мух предотвращает проявление мутаций в гене *Sxl* (Sex-lethal), отвечающем за трансляцию и сплайсинг в процессах оогенеза, митотическую рекомбинацию и соматическое определение пола (Starr, Cline, 2002). Другие исследования предполагают взаимодействие бактерии с геном *chico*, кодирующим белки, являющиеся субстратом для инсулинового рецептора, участвующего в регуляции роста (Clark *et al.*, 2005). Некоторые аллели этого гена являются летальными для хозяина в отсутствие *Wolbachia*. Было установлено, что у паразитической осы *Leptopilina heterotoma* эндосимбионт отрицательно влияет на плодовитость, двигательную активность и ПЖ хозяина (Fleury *et al.*, 2000), а у *D. simulans* вызывает сокращение продукции спермы (Snook *et al.*, 2000). Было также показано, что у *D. simulans* и *D. melanogaster* влияние бактерии на ПЖ и плодовитость зависит от генотипа мух (Fry *et al.*, 2004; Dean, 2006). В то же время обнаружен штамм *Wolbachia* *wAu*, который не влияет на организм хозяина (*D. simulans* и *D. melanogaster*) (Hoffman *et al.*, 1996; Riegler *et al.*, 2005). Высказано предположение, что влияние бактерии на хозяина в этом случае, вероятно, отличается от ранее изученного и поэтому не обнаруживается современными

методами (Iturbe-Ormaetxe, O'Neill, 2007). У некоторых линий мух было обнаружено положительное действие *Wolbachia* на ПЖ хозяина (Вайсман и др., 2009; Вайсман и др., 2013). Предложена идея негативного и позитивного влияния одного или разных генотипов бактерии на *Drosophila*, которые, возможно, имеют неодинаковую природу (Вайсман и др., 2009). В экспериментах, проведённых авторами показано, что у шести пар линий мух при оптимальных или стрессовых условиях воздействие эндосимбионта на организм хозяина проявлялось только в 20 % случаев. Влияние бактерии на хозяина зависело от генотипа мух, условий среды и являлось пол-специфичным (Вайсман и др., 2009). Таким образом, исследование функциональной роли генов *Wolbachia* во взаимоотношении с хозяевами даёт возможность учёным манипулировать геномом бактерии для более детального понимания роли эндосимбионта в эволюции (Iturbe-Ormaetxe, O'Neill, 2007).

#### **1.2.4.1. Репродуктивные модификации, вызываемые *Wolbachia* в организме хозяина**

Бактерии *Wolbachia* встречаются у многих животных. На сегодняшний день известно четыре репродуктивные модификации, происходящие под влиянием бактерий, которые приводят к успешному размножению и распространению эндосимбионта. К ним относятся: цитоплазматическая несовместимость (ЦН), партеногенез, феминизация, андроцид.

##### *Цитоплазматическая несовместимость*

Вызываемая *Wolbachia* ЦН является репродуктивной модификацией, при которой потомки от инфицированных самцов и неинфицированных самок являются нежизнеспособными (Telschow *et al.*, 2007). Цитоплазматической она называется потому, что передаётся потомкам от самки через цитоплазму яйца. Существует две

основных формы ЦН (Рис. 3). В односторонней цитоплазматической несовместимости участвует только один штамм *Wolbachia*. Если самец, инфицированный бактерией, спаривается с неинфицированной самкой, выживает небольшое по сравнению с остальными возможными скрещиваниями число потомков. Это обусловлено несовместимостью между яйцеклеткой и сперматозоидом. Двусторонняя ЦН вызывается двумя штаммами *Wolbachia* и может проявляться, когда спаривающиеся партнёры заражены разными штаммами бактерий (Telschow *et al.*, 2007).

	W1 ♀	W2 ♀	∅ ♀
W1 ♂	W1	†	†
W2 ♂	†	W2	†
∅ ♂	W1	W2	∅

Рис. 3. Схематическое изображение односторонней и двусторонней ЦН. Особи, инфицированные разными штаммами *Wolbachia*, обозначены как W1 и W2, неинфицированные обозначены как ∅; более высокий уровень эмбриональной смертности обозначен как † (из Charlat, 2001).

ЦН обнаружена в трех крупных таксономических группах членистоногих. Среди насекомых эта модификация известна в отрядах Diptera, Lepidoptera, Coleoptera, Homoptera, Hemiptera, Orthoptera; среди ракообразных в отряде Isopoda (Rousset *et al.*, 1992); среди паукообразных в отряде Acari (Breeuwer, 1997). Как уже упоминалось выше, Йен и Бар (Yen, Barr, 1971) впервые связали ЦН с бактериальной

инфекцией. Бактерии *Wolbachia* были обнаружены в цитоплазме клеток ранних эмбрионов *C. pipiens*. Для доказательства их роли в явлении несовместимости Бар с сотрудниками провели элиминацию бактерий тетрациклином (Portaro, Barr, 1975). Исчезновение бактерий из клеток насекомых, подтвержденное методом электронной микроскопии, приводило к тому, что самцы обработанной линии становились совместимыми с самками любого происхождения, а неинфицированные самки давали потомство только при скрещивании с такими же самцами. Неинфицированные самки после скрещивания с зараженными самцами оставались стерильными.

Цитологический механизм несовместимости изучался у *C. pipiens*, *D. simulans* и *Nasonia vitripennis*. У *D. simulans* и *N. vitripennis* были выявлены различия в поведении хромосом в первом митотическом делении инфицированных и неинфицированных особей (Lassy, Karr., 1996). В норме у *D. simulans* после проникновения спермия в яйцо происходит деконденсация хроматина спермия и замещение спермиоспецифичных гистоноподобных белков на гистоны яйцеклетки, а затем - репликация хромосом и конденсация хроматина, причем конденсация материнского хроматина начинается немного раньше, чем хроматина отцовского (Lassy *et al.*, 1996). После конденсации хромосомы собираются в метафазной пластинке веретена деления и прикрепляются к нитям веретена, но не смешиваются в экваториальной плоскости, а одновременно вступают в анафазу как два независимых набора, смешивающиеся уже во время телофазы. В несовместимых скрещиваниях во время первого митоза отцовские хромосомы не конденсируются, оставаясь бесформенной диффузной массой, и лежат в стороне от метафазной пластинки, в то время как материнские вступают в анафазу (Callaini *et al.*, 1997).

Нарушение конденсации хроматина в первом митотическом делении происходит и у *N. vitripennis* (Reed *et al.*, 1995). Использование генетических маркеров в экспериментальных скрещиваниях показало, что впоследствии отцовские хромосомы элиминируются из оплодотворенных яиц (Richardson *et al.*, 2004). В редких случаях гены самца все же передаются потомству (Ryan *et al.*, 1985). По мнению авторов, эта редкая передача происходит, вероятно, потому, что хромосомные фрагменты могут случайным образом связываться с движущимися хромосомами самки в делящемся ядре.

Молекулярный механизм взаимодействия *Wolbachia* с хромосомами хозяина пока не выяснен. В зрелой сперме бактерии не найдены (Дудкина и др., 2004), поэтому эндосимбионты должны каким-то образом действовать на созревающую сперму, которая затем попадет в яйцо во время оплодотворения. Подобный "импринтинг" спермы возможен или за счет присоединения к ней секретлируемых *Wolbachia* продуктов, которые приводят к нарушению конденсации хроматина, или же за счет модификации, либо устранения нормальных составляющих спермы в процессе созревания (Горячева, 2004). Мишенью для бактерии могут служить белки, попадающие в зиготу из сперматозоида. Это, прежде всего, белки отцовской центриоли, которая, сливаясь с материнской центриолью, формирует центр образования микротрубочек зиготы. Микротрубочки формируют впоследствии веретено деления, правильное и точное функционирование которого обеспечивает сегрегацию хромосом в митозе. Помимо отцовской центриоли, в зиготу у многих видов *Drosophila* попадает жгутик сперматозоида, который, по мнению ряда авторов, также может оказывать влияние на раннее развитие эмбриона (Горячева, 2004).

### Партеногенез

*Wolbachia* вызывает партеногенез в основном у животных отряда Hymenoptera, трипсов (Thysanoptera), клещей (Acari: Tetranychidae) и коллембол (Charlat *et al.*, 2003). Эта репродуктивная модификация проявляется у животных, имеющих гаплодиплоидное определение пола: самцы – гаплоидны, а самки – диплоидны. Основное действие бактерий заключается в диплоидизации гаплоидных яиц, из которых развиваются диплоидные самки. Это проявляется благодаря различным формам образования диплоидных гамет, в результате которой появляется полностью гомозиготное потомство (Suomalainen *et al.*, 1987). У видов рода *Trichogramma* диплоидизация происходит в результате остановки первого деления мейоза во время анафазы. У паразитического наездника (*Muscidifurax uniraptor*) и розанной орехотворки (*Diplolepis rosae*) первое деление мейоза происходит нормально, с образованием двух дочерних гаплоидных клеток. После репликации генетического материала две диплоидные клетки сливаются, и формируется тетраплоидный набор хромосом. Во второй профазе митоза происходит деление ядра, которое приводит к образованию двух диплоидных клеток (Gottlieb *et al.*, 2002).

Показано, что у неинфицированных паразитических наездников *T. sacoesiae* популяция состоит только из самок, размножающихся партеногенетически (Vavre *et al.*, 2004). В процессе мейоза происходит только одно деление и в яйцеклетке остаётся диплоидный набор хромосом. Это позволило предположить, что механизмы естественного и вызываемого бактериями партеногенеза различны (Vavre *et al.*, 2004).

### Феминизация

Феминизирующий симбионт *Wolbachia* найден у наземных ракообразных



отряда Isopoda и насекомых отряда Lepidoptera (Stothammer *et al.*, 1999). Впервые эта репродуктивная модификация была описана в серии работ французских учёных (Legrand, Juchault, 1986; Rigaud, 1991), которые показали, что эндосимбионты воздействуют на систему выработки андрогенного гормона. При отсутствии этого гормона из эмбриона развивается самка, при его наличии - самец. У зародышей мокриц мужского пола бактерии *Wolbachia* подавляют развитие андрогенной железы, вырабатывающей данный гормон. Если заразить эндосимбионтом более взрослого самца мокрицы, у которого уже имеется андрогенная железа, все равно происходит частичная феминизация, хотя деятельность андрогенной железы при этом продолжается. При частичной феминизации появляются интерсексы - особи с различными сочетаниями мужских и женских признаков. По-видимому, в этом случае *Wolbachia* подавляет способность тканей адекватно реагировать на андрогенный гормон.

У насекомых (моль *Ostrinia furnacalis*, *Ostrinia scapulalis* и бабочка *Eurema hecabe*) детерминация и, соответственно, механизм дифференциации пола принципиально отличается от такового у ракообразных, прежде всего потому, что пол у них дифференцируется на эмбриональной стадии и развитие признаков пола не связано с половыми гормонами, действующими на поздних стадиях преимагинального развития (Kageyama *et al.*, 2002). У *O. furnacalis* *Wolbachia* оказывает действие на эмбрионы, поскольку пол бабочки детерминируется на эмбриональной стадии развития. Вылеченные тетрациклином личинки развиваются в самок (Горячева, 2004). Из этого видно, что воздействие эндосимбионта на хозяина может иметь комплексный характер. Разные механизмы воздействия могут дублировать и "подстраховывать" друг друга.

*Андроцид*

Андроцидом, или бессамцовостью (в английской транскрипции - male-killing или убийство самцов) называют репродуктивную модификацию, вызванную цитоплазматическими бактериями, которая проявляется в дифференциальной смертности особей мужского пола. При этом взрослое потомство инфицированных самок уменьшается вдвое по сравнению с числом отложенных яиц и состоит полностью или преимущественно из особей женского пола, поскольку самцы гибнут на той или иной стадии преимагинального развития (Горячева, 2004).

Андроцид был первым описанным у животных "необычным" эффектом, возникающим под влиянием цитоплазматических симбионтов. Лус (Lus, 1947) впервые отметил отсутствие самцов в ленинградской популяции двуточечной божьей коровки *Adalia bipunctata* L. (Insecta: Coleoptera: Coccinellidae). Он показал наследование этой особенности строго по материнской линии, но допускал возможность её детерминации ядерными генами. Вывод о бактериальной природе бессамцовости был сделан английскими исследователями в 1992 г. после серии экспериментов по восстановлению нормальной репродукции под влиянием антибиотиков (Hurst *et al.*, 1992). В последующее десятилетие в Англии были параллельно выполнены комплексные работы по идентификации цитоплазматических симбионтов *A. bipunctata*, в ходе которых было показано, что двуточечная божья коровка инфицирована тремя различными бактериями - *Rickettsia*, *Spiroplasma* и *Wolbachia*, имеющими одинаковый фенотипический эффект (Werren *et al.*, 1994).

Помимо *A. bipunctata* бессамцовость, возникающая под влиянием бактерий *Wolbachia*, описана только у двух близкородственных видов тропических бабочек

рода *Acraea* - *Acraea encedon* и *Acraea encedana* (Jiggins, *et al.*, 1998), несмотря на то, что явление цитоплазматической бессамцовости известно сейчас почти у 20 видов насекомых и клещей (у них бессамцовость обусловлена присутствием других бактерий).

Интересно, что у *D. bifasciata* было выявлено различное фенотипическое проявление присутствия *Wolbachia* в зависимости от степени инфицированности насекомых. После частичной элиминации бактерий повышенной температурой у мух в потомстве развивались заражённые самки и самцы, тогда как *Wolbachia* с исходной плотностью распределения вызывали андроцид (Hurst *et al.*, 1999).

#### **1.2.4.2. Влияние *Wolbachia* на жизнеспособность хозяина**

##### *Влияние Wolbachia на продолжительность жизни*

ПЖ взрослой мухи с момента её вылупления из куколки в лабораторных условиях составляет 1-2 месяца и в значительной мере зависит от условий содержания (температуры, влажности, пищи, плотности населения, наличия в питательной среде бактерий) (Медведев, 1966). У мутантных форм выживаемость в большинстве случаев понижена по сравнению с диким типом. Однако встречаются мутантные линии с повышенной по сравнению с нормальными мухами жизнеспособностью. Показано, что эндосимбиотические бактерии оказывают как положительное, так и отрицательное действие на ПЖ и выживаемость *Drosophila* (Fry *et al.*, 2004; Вайсман и др., 2009). Питание и окружающая среда в течение всей жизни насекомого значительно влияют на популяцию бактерий (Broderick *et al.*, 2004). Было установлено, что разнообразие бактерий, найденных в пищеварительном тракте личинок бабочек *Lymantria dispar*, находится в тесной зависимости от корма, на котором содержатся насекомые (Broderick *et al.*, 2004).

Интересно, что у некоторых линий *D. melanogaster* (*Canton S* и *w1118*) присутствие эндосимбионта во взрослом организме увеличивает его приспособленность на 30-35 % в течение первой недели развития, а в последние дни жизни имаго выявляется небольшой отрицательный эффект бактерии на ПЖ, и происходит массовая гибель хозяина (Brummel *et al.*, 2004). Изменения иммунной системы могут способствовать увеличению ПЖ, защищая хозяина от инфекции. Выявлено существование зависимости между возрастом мухи и экспрессией генов иммунного ответа (DeVeale *et al.*, 2004). Старые особи более подвержены инфекции и позволяют патогенным бактериям свободно размножаться (Garsin *et al.*, 2003). Генотип хозяина также играет большую роль в жизнеспособности организма (Вайсман и др., 2009). Таким образом, существует как негативное, так и позитивное влияние *Wolbachia* на организм хозяина. Одним из примеров является штамм *wMelPop*, который при пониженной и повышенной температурах по-разному воздействует на мух (Min, Benzer, 1997; Вайсман и др., 2009).

#### *Влияние Wolbachia на иммунитет хозяина*

*Wolbachia* обнаруживаются в гемолимфе насекомых, поэтому считается, что они могут непосредственно взаимодействовать с молекулами, секретируемыми в результате гуморального иммунного ответа хозяина (Dobson *et al.*, 1999; Haselkorn, 2010). Показано, что присутствие *Wolbachia* в организме мух *Drosophila simulans* и комаров *Aedes albopictus* не приводит к активации противомикробных пептидов (AMP или antimicrobial peptides) хозяина (Bourtzis *et al.*, 2000). Однако в семенниках личинок *Drosophila melanogaster*, инфицированных непатогенным штаммом *Wolbachia wMel*, обнаружено повышение активности генов гуморального и клеточного иммунного ответа, включая 2 гена AMP (*Drosomycin* и *Lysozyme*) (Zheng

*et al.*, 2011). В противоположность этому, у комаров *Anopheles gambia*, инфицированных *Wolbachia* штамма *wAlbB* и *wRi*, выявлено снижение активности 75 % генов, вовлечённых в иммунный ответ (Hughes *et al.*, 2011). Таким образом, характер взаимодействия *Wolbachia* с иммунной системой хозяина сильно зависит от вида насекомого и штамма бактерии. Интересно, что у паразитических ос *Asobara tabida* регуляция генов иммунного ответа природными штаммами *Wolbachia wAtab1*, *wAtab2* и *wAtab3* является ткане- и пол-специфичной (Kremer *et al.*, 2012).

Показано, что *Wolbachia* могут защищать организм хозяина от других бактериальных инфекций. Например, у комаров *Aedes aegypti*, искусственно заражённых *Wolbachia* штамма *wMelPop*, выявлена повышенная устойчивость к инфекции грамотрицательными бактериями *Erwinia carotovora* (Kambris *et al.*, 2009). Однако, в природных популяциях *Drosophila*, инфицированных *Wolbachia*, влияния на инфекцию других бактерий обнаружено не было (Wong *et al.*, 2011). Можно предположить, что естественная и искусственно внедрённая инфекция *Wolbachia* по-разному регулирует иммунный ответ у различных хозяев (Eleftherianos *et al.*, 2013). Помимо усиления противодействия бактериальным инфекциям, *Wolbachia* может увеличивать устойчивость к заражению вирусами. Показано, что в природе *D. melanogaster*, инфицированные *Wolbachia* штамма *wMelPop* и *wMelCS*, дольше живут, лучше справляясь с инфекцией РНК вирусами DCV (*Drosophila C Virus*) и FHV (*Flock House Virus*), чем неинфицированные мухи (Hedges *et al.*, 2008). Установлено также, что заражение комара *A. aegypti* бактериями *Wolbachia* штамма *wMelPop-CLA* приводит к снижению способности вируса Денге и Чикунгуньи создавать устойчивую популяцию в тканях комара. Недавние исследования продемонстрировали участие *Wolbachia* в защите организма хозяина от атак

паразитических ос. Так у *D. simulans* и *D. melanogaster* инфекция *Wolbachia* штамма *wRi* и *wMel*, соответственно, снижает эффективность развития яиц паразитической осы внутри тела хозяина (Martinez *et al.*, 2012).

Таким образом, взаимодействие *Wolbachia* с иммунной системой хозяина является сложным процессом и требует всестороннего анализа реакции обоих партнёров симбиотической ассоциации. Последние открытия, сделанные в данной сфере, открывают перед учёными широкий спектр вопросов и будущих задач, финальной целью которых является правильное использование бактерий *Wolbachia* в качестве безвредного для окружающей среды биологического оружия против переносчиков различных заболеваний человека и вредителей сельского хозяйства.

#### **1.2.4.3. Влияние бактерий *Wolbachia* штамма *wMelPop* на продолжительность жизни *D. melanogaster***

Бактерии *Wolbachia* штамма *wMelPop* были случайно обнаружены в линии *D. melanogaster w1118* при поиске мутаций, влияющих на нервную систему (Min, Benzer, 1997). Эта линия мух характеризовалась тем, что нейродегенеративные процессы приводили к ранней гибели насекомого. При нормальной температуре (25 °C) мухи погибали в течение месяца, а при повышенной температуре (29 °C) – за одну-две недели. Генетический анализ выявил цитоплазматическую природу фактора ранней гибели. В линии была обнаружена бактерия *Wolbachia*, пролиферация которой вызывала разрушение клеток мозга, что приводило к ранней гибели мух. Этот симбионт был также обнаружен в яичниках, сетчатке и мышцах *D. melanogaster*. На основе такого фенотипического действия и электронно-микроскопического анализа штамм получил название «*wMelPop*», от слова «popcorn», за сходство ультраструктурной картины пролиферации бактерии с

лопающимися зёрнами кукурузы. Спустя несколько лет исследователи показали, что действие бактерий этого штамма элиминируется при 19 °С (Reynolds *et al.*, 2003). Предполагают, что размножение бактерий идёт слишком медленно при такой температуре и летального уровня развития инфекции не достигается (Reynolds *et al.*, 2003). При 29 °С происходит сокращение ПЖ в результате резкого увеличения плотности *Wolbachia* в клетках мозга (Min, Benzer, 1997). Влияние бактерии на ПЖ насекомого может способствовать разработке методов борьбы с вредителями сельского хозяйства, хотя использование этих методов будет зависеть от климатических условий, в которых размножаются насекомые (Reynolds *et al.*, 2003).

### **1.3. *Drosophila* – удобный объект для исследования взаимодействия *Wolbachia* с организмом хозяина**

Впервые плодовую мушку *Drosophila melanogaster* в качестве объекта генетических исследований использовал Т. Морган (Жимулёв, 2003). Уже во второй половине XX века она стала одним из основных модельных организмов. На сегодняшний день очень хорошо изучена генетическая и структурно-функциональная организация дрозофилы (Roberts, 1998). Помимо этого, плодовая мушка очень удобна для различных научных исследований, потому что она проста в содержании в лабораторных условиях и имеет короткий жизненный цикл, что способствует проведению детальных исследований на всех уровнях развития.

Как уже упоминалось выше, *Wolbachia* являются эндосимбионтами *Drosophila*. Анализ морфологических особенностей как бактерии, так и хозяина очень важен для понимания отношений в системе эндосимбионт-хозяин. Так, например, интересные данные были получены при исследовании структурной организации и поведения *Wolbachia* в яичниках и ранних эмбрионах *D. melanogaster* с использованием

методов электронной микроскопии. Впервые с высоким разрешением было продемонстрировано, что бактерии могут формировать вакуоли секреторного типа и тесно контактировать с мембранами шероховатого ЭПР и митохондриями (Воронин и др., 2009). Была также показана способность *Wolbachia* образовывать споро-подобные структуры (Дудкина и др., 2004). Поэтому использование для исследований хорошо изученной генетически *D. melanogaster* очень перспективно и удобно. Ранее упомянутые *Wolbachia* штамма wMelPop являются уникальными, поскольку, помимо репродуктивных органов, они встречается в сетчатке, мышцах и клетках мозга *D. melanogaster*. Так как одной из целей данной дипломной работы являлось исследование ультраструктуры и локализации бактерий этого штамма в клетках мозга насекомого, было необходимо изучить строение мозга *D. melanogaster*.

### **1.3.1. Строение мозга *Drosophila melanogaster***

Структурные и поведенческие свойства нервной системы *Drosophila* имеют определённое эволюционное сходство с позвоночными. Центральная нервная система взрослых мух состоит из надглоточного и подглоточного ганглиев, которые формируют мозг насекомого, а также из сегментного ганглия, образующего брюшной нервный ствол (Reichert, Boyan, 1997). Надглоточный ганглий, часто называемый «передним мозгом» или просто «мозгом», формируется из протоцеребрума, дейтоцеребрума и тритоцеребрума. Протоцеребрум является самой большей частью как надглоточного ганглия, так и всего мозга. В нём различают две выраженные области нейропилей, таких как грибовидные тела и центральный комплекс. Хорошо заметные оптические доли, которые получают зрительную информацию от сложноустроенных глаз, также связаны с протоцеребрумом.



Дейтоцеребрум по размерам меньше протоцеребрума и состоит из антеннальных долей и области спинной доли. Тритоцеребрум является самой маленькой частью надглоточного ганглия. Подглоточный ганглий или «задний мозг» состоит из объединённых мандибулярных, максиллярных и лабиальных нейромеров, структурная организация которых сходна с нейромерами брюшного нервного ствола. Каждый центр мозга мух выполняет жизненно важные функции. Антеннальные доли представляют собой сеть нейронов первого порядка хемочувствительного пути. Они состоят из множества гломерул (сферических образований), которые пронизаны терминалями обонятельных рецепторов. В центральном комплексе разделяют: эллипсоидное тело (ellipsoid body), веерообразное тело (fan-shaped body), верхнюю арку (superior arch), узелки (noduli) и протоцеребральный мост (protocerebral bridge). Весь комплекс отвечает за визуальную память, пение и ухаживание, а также контролирует полёт насекомого. Срединный узел состоит из двух больших пучков восходящих нейронов, которые формируют обширную систему терминалей. В этом центре сходятся аксоны от различных центров мозга. Грибовидные тела – самый сложный и привлекающий внимание многих исследователей отдел мозга. Он состоит из разделённых на две доли сети нейронов, каждая из которых включает в себя чашевидную полость (calyx neuropil) и ножку (pedunculus). Грибовидные тела отвечают за память местоположения, ассоциативную, обонятельную память, двигательную функцию, сон, а также за обучение и выбор реакции относительно различных обстоятельств. Зрительные доли, состоящие из нескольких отделов, содержат множество аксонов нейронов и отвечают за визуализацию предметов. Подглоточная сеть нейронов состоит из трёх ганглиев, каждый из которых иннервируется от всех частей ротовой

полости, а также слюнных желёз и некоторых мышц.

В тканях мозга различают нейроны, находящиеся в окружении глиальных клеток, которые создают специфическое микроокружение, обеспечивая условия для генерации нервного импульса и некоторые метаболические процессы. Они составляют волокнистое вещество нервной ткани (нейропиль), в котором сосредоточены синаптические контакты между отростками нейронов.

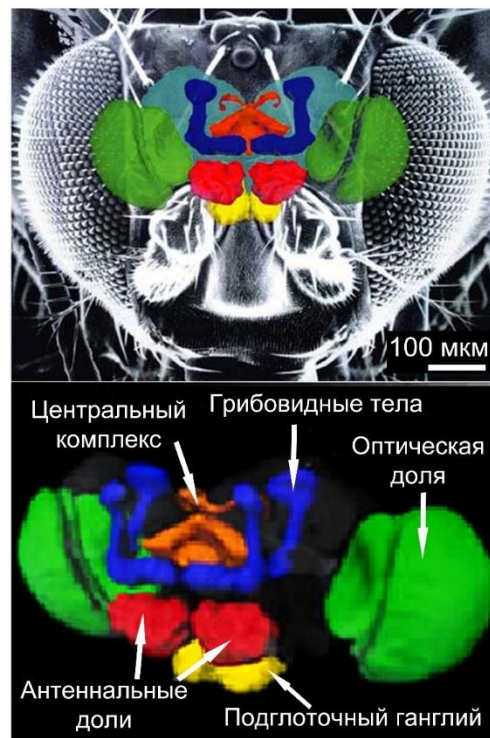


Рис. 4. Схема, демонстрирующая расположение основных центров в разных отделах мозга *D. melanogaster* (из Heisenberg, 2003).

#### **1.4. Влияние неблагоприятных факторов среды на взаимоотношение эндосимбионта и хозяина**

К основным неблагоприятным факторам окружающей среды, влияющим на жизнедеятельность эндосимбионтов, относят стрессовые температуры, голодание, внеклеточный pH, различные детергенты, тяжёлые металлы и др. Для *E. coli* показано, что даже небольшие изменения значения pH в кишечнике могут негативно

повлиять на их пролиферацию, в результате чего происходит резкое снижение численности бактерий (Thran, 2003). Было обнаружено, что уровень инфицированности хозяина находится в тесной зависимости от температуры окружающей среды, как правило, уменьшаясь при её низких значениях и возрастая при повышении температуры (Thomas, Blanford, 2003). Тяжелые металлы негативно воздействуют на активность популяции бактерий, понижая её до нуля при высокой концентрации (Rajapaksha, 2004).

К настоящему времени накопилось большое количество данных, свидетельствующих о консервативности в реакциях организмов, эволюционно разошедшихся миллионы лет назад, на различные стрессовые условия. Установлено, что при высоко консервативном стрессовом ответе происходит выключение транскрипции некоторых основных генов и активация блока генов, кодирующих белки теплового шока (heat shock proteins, Hsp), или стрессовые белки (Scott, Pardue, 1981). Hsp помогают клетке сохранять правильную конформацию белков, обеспечивают их точное перемещение к различным органеллам и способствуют транспорту вновь синтезированных белков к нужной структуре (Craig *et al.*, 1994). Белки теплового шока играют большую роль в клетке и в не стрессовых условиях, влияя на специфические стадии развития различных тканей. Существует ряд условий, при которых происходит инициация синтеза Hsp's (Swamynathan *et al.*, 1996):

1. Воздействие факторов окружающей среды (тяжёлые металлы, тепловой шок, внеклеточный рН, различные детергенты).

2. Патологические состояния организма (лихорадка, вирусная или бактериальная инфекции, изменение внутриклеточного рН).

3. Различные стадии клеточного цикла (переход со стадии G1 на стадию S, стадия S) и развития организма (эмбриональное развитие, сперматогенез).

#### **1.4.1. Действие повышенных и пониженных температур на систему эндосимбионт – хозяин**

К концу XX века многие исследования показали, что температура окружающей среды сильно влияет на последствия инфекции в организме. Так, например, даже незначительные температурные изменения могут воздействовать на устойчивость хозяина к инфекционному агенту, а также влиять на вирулентность и размножение паразита (Thomas, Blanford, 2003). Поэтому изучение влияния температуры на биохимические, физиологические процессы и поведение хладнокровных животных является важным и актуальным для понимания процессов динамики и коэволюции в системе эндосимбионт-хозяин. К настоящему времени проведено большое количество исследований температурной чувствительности организмов, которую английские учёные Томас и Бланфорд (Thomas, Blanford, 2003) предложили изображать в виде нелинейной функции зависимости приспособленности животного от температуры окружающей среды (Рис. 5 а). Длительное воздействие критических минимальной и максимальной температур приводит к гибели организма (Thomas, Blanford, 2003). В таком же виде было предложено изображать приспособленность организмов для симбиотической ассоциации (Рис. 5 б). Если кривые эндосимбионта и хозяина сильно различаются, то даже небольшие перепады температуры могут кардинально влиять на их взаимоотношение.

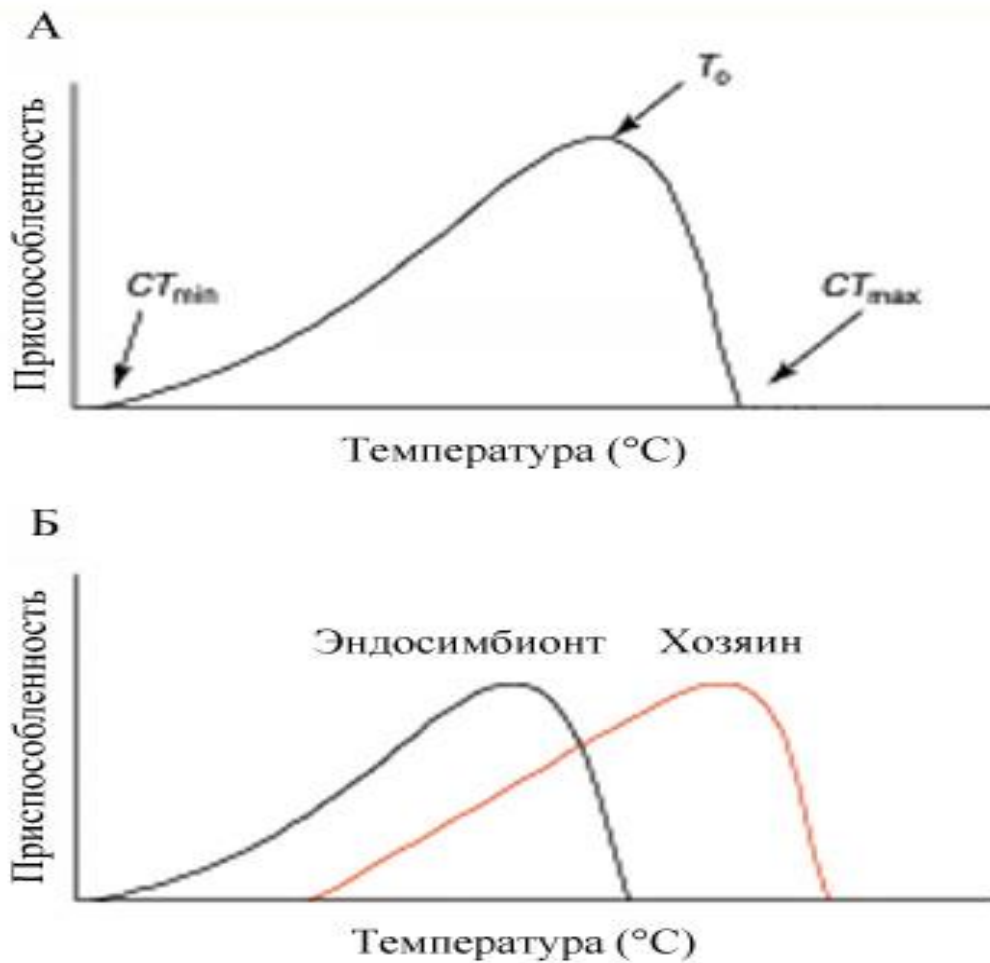


Рис. 5. (А) График, демонстрирующий температурную чувствительность организма.  $T_0$  - оптимальная температура,  $CT_{max, min}$  - критический максимум и минимум, при которых адаптация отсутствует. (Б) График, демонстрирующий уровни приспособленности организмов симбиотической ассоциации при изменении температуры окружающей среды (взято из Thomas, Blanford, 2003).

Влияние повышенных температур достаточно хорошо изучено на *D. melanogaster*. В таблице 2 представлены эффекты, проявляющиеся у этих насекомых при воздействии различных температур.

Таблица 2. Действие различных температур на жизнедеятельность

*D. melanogaster* (из Медведев, 1966; Feder, Krebs, 1997)

Температура	Влияние на жизнеспособность <i>D. melanogaster</i>
10 °С	Личиночный период растягивается до 57 дней
20 °С	Личиночный период равен 8 дням
25 °С	Цикл развития равен 10 суткам (оптимальная температура в лабораторных условиях)
27 °С	Максимальная плодовитость
29 °С	75 % максимальной плодовитости, ограничение на продолжительное поддержание популяций в лабораторных условиях
31 °С	Ограничение на продолжительное существование природной популяции
32 °С	40 % от максимальной плодовитости
33 °С	29 % от максимальной плодовитости, 66 % от нормального размера взрослой мухи
35 °С	Прекращение окукливания, откладка яиц, копуляция
36 °С	1 час воздействия приводит к уменьшению плодовитости, мухи прекращают есть
37 °С	Взрослые мухи прекращают двигаться
38 °С	После 1 часа воздействия гибнет 50 % личинок
39 °С	После 30 минут воздействия гибнет 50 % личинок
40 °С	После 16 минут воздействия гибнет 50 % личинок
41 °С	После 8 минут воздействия гибнет 50 % личинок

Изменение пуфов политенных хромосом слюнных желез, как ответ на тепловой шок при воздействии повышенной температуры, было впервые открыто на плодовой мушке (Ritossa, 1962). Hsp70 является основным белком, который синтезируется в этот период. Его концентрация в клетке, низкая при 25 °С, возрастает в тысячу раз при 37 °С, что свидетельствует о его огромной роли в термочувствительности организма (Solomon *et al.*, 1991). Интересно, что существует зависимость эффекта Hsp70 на клетку от количества его копий в геноме *Drosophila* (нормальное количество составляет 12 копий на диплоидный набор хромосом). Уменьшение числа копий этого гена делает мух более подверженными стрессовым температурам (Gong, Golic, 2006).

#### **1.4.2. Влияние повышенных и пониженных температур на взаимоотношение эндосимбионта и хозяина**

Несмотря на значительные успехи в изучении роли бактерии *Wolbachia* в организме хозяина, молекулярные механизмы взаимоотношений в системе эндосимбионт-хозяин до сих пор остаются неизвестными. Большой проблемой для учёных является то, что бактерия трудно культивируется в условиях *in vitro*. Необходимость ставить эксперименты на живом материале сильно усложняет задачу, поскольку динамика уровня инфекции зависит от генотипа хозяина, его питания, а также от его возраста, влияющего на экспрессию генов (Veneti *et al.*, 2004). Сильный эффект имеют стрессовые условия окружающей среды: повышенные или пониженные температуры, голодание, внеклеточный pH. Так, например, показано, что *Wolbachia* могут элиминироваться из организма хозяина при повышенных (30 – 33 °С) или пониженных температурах (периоды диапаузы хозяина: 10-30 дней при 12 °С, 3-6 месяцев при 3 °С) (Opijnen *et al.*, 1999; Dobson *et*

*al.*, 2001; Pintureau, 2003). Аналогичная ситуация имеет место в симбиотической ассоциации бактерии *Spiroplasma* и *D. nebulosa* (природный хозяин) или *D. melanogaster* (искусственно заражённый симбионт). В обеих линиях при 18 °C уровень инфекции резко уменьшается, а при 28 °C снижение происходит постепенно. При нормальной температуре (25 °C) инфицированность стабильно сохраняется. Установлено, что низкие температуры снижают концентрацию бактерий в организме и отрицательно влияют на вертикальный перенос *Spiroplasma*. Высокие же температуры предпочтительно негативно влияют на вертикальный перенос *Spiroplasma* (Anbutsu *et al.*, 2008). Было обнаружено, что тепловой шок снижает уровень ЦН у инфицированных насекомых, предположительно потому, что повышенные температуры увеличивают продукцию спермы, что способствует её быстрому выведению из семенников, в результате чего резко уменьшается воздействие инфекции на фертильность заражённых *Wolbachia* самцов (Snook *et al.*, 2000). На ультраструктурном уровне было показано, что стрессовые температуры у мух вызывают появление специфических электронно-плотных гранул, содержащих, как предполагают, хит-шоковые белки, и крупных лизосом в цитоплазме клеток яичника (Жукова и др., 2008). У бактерий при этом обнаруживаются существенные нарушения строения оболочки и другие структурные изменения. Таким образом, и эндосимбионт, и хозяин реагируют на повышенную температуру, однако, характер их взаимодействия не меняется (Жукова и др., 2008). Следует отметить, что для правильной интерпретации данных о влиянии различных температур окружающей среды на взаимоотношения симбионтов, очень важно учитывать действие экологических факторов на популяцию исследуемых хозяев (Montllor *et al.*, 2002).



## Заключение

Анализ литературных данных свидетельствует о том, что, несмотря на интенсивные исследования, механизмы взаимоотношений эндосимбионта и хозяина во многом пока не изучены. Одним из подходов к решению данной проблемы является построение моделей природных воздействий стрессовых температур на систему эндосимбионт-хозяин. Удобным объектом для таких исследований являются *D. melanogaster* и её эндосимбионт *Wolbachia*. Согласно данным электронной микроскопии, а также результатам, полученным с использованием общебиологических и молекулярных методов, бактерии оказывают разнообразное воздействие на организм хозяина, которое зависит от условий окружающей среды, генотипа хозяина и является пол-специфичным. *Wolbachia* штамма wMelPop при повышенной температуре вызывает нейродегенеративные процессы в соматических тканях *Drosophila*, что отрицательно сказывается на ПЖ насекомого (Min, Benzer, 1997). При низких же температурах воздействие бактерии уменьшается, и ПЖ мух в некоторых случаях оказывается даже выше нормы. Механизмы этих процессов на сегодняшний день недостаточно изучены. Поэтому в настоящей работе была поставлена цель – с помощью комплекса методов, включающих в себя популяционный и молекулярный анализ, просвечивающую электронную микроскопию, флуоресцентную гибридизацию *in situ*, изучить действие *Wolbachia* штамма wMelPop на организм *D. melanogaster* и проанализировать характер взаимодействия эндосимбионта и хозяина в условиях температурного стресса и на разных стадиях жизненного цикла мух.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Характеристика использованных в работе лабораторных линий мух, температурные режимы их содержания и схемы популяционных экспериментов

В данной работе использовалась линия *Drosophila melanogaster* w1118, предоставленная профессором Скотом О'Нейлом (Университет Квинсленда, Австралия). Линия мух была инфицирована бактерией *Wolbachia* (штамм wMelPop). *D. melanogaster* содержали на стандартном изюмном корме при + 22-25 °С. Неинфицированную линию w1118T получили путём содержания мух в течение двух-трёх поколений на корме с добавлением 0,02 - 0.03 % тетрациклина (вес/объём) на стандартном корме при + 22-25 °С. Проверку инфицированного и неинфицированного статуса линий проводили с помощью молекулярно-биологических методов (см. ниже).

Первый эксперимент по выживаемости инфицированных и неинфицированных самок проводился при температурных режимах двух типов, условно обозначенных I и II (Рис. 6). В каждом отдельном эксперименте использовали от 90 до 210 мух, помещая по 30 особей на сосуд со стандартным изюмным кормом. *D. melanogaster* развивались при комнатной температуре (23-25 °С). Вылетевшие из куколок в течение дня имаго переносили на определённый температурный режим. При режимах I мух постоянно содержали при умеренной (25 °С) или повышенной (29 °С) температурах. Учёт выживаемости проводили каждые 1-2 дня до полной гибели мух.

При режимах II мух содержали определённое количество дней (3, 7 и 13) при повышенной температуре (29 °C), а затем переносили на 16 °C. Учёт выживаемости после переноса мух на 16 °C проводился каждые 5 дней до полной гибели мух. В качестве контроля к режиму II использовались *D. melanogaster*, постоянно содержащиеся при 16 °C.

Кривые выживаемости мух были построены по методу Каплана-Майера, главным преимуществом которого является учёт особей, выпавших по какой-либо причине из эксперимента.

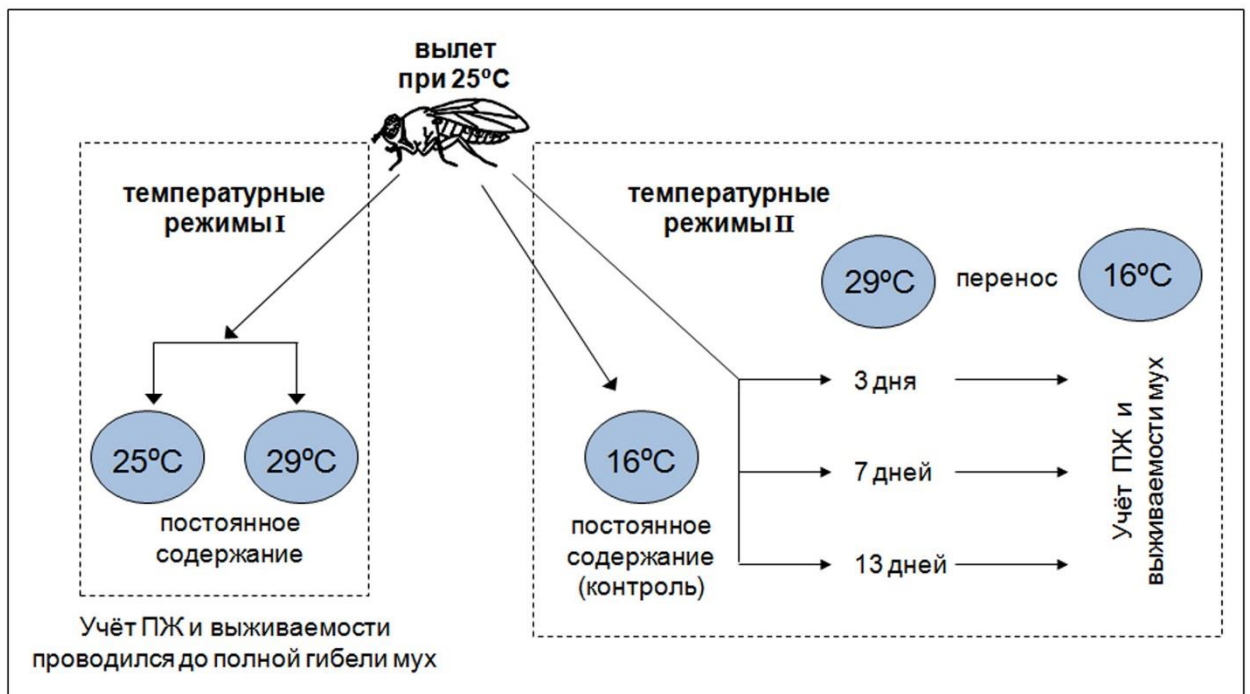


Рис. 6. Схема эксперимента по исследованию продолжительности жизни (ПЖ) и выживаемости *D. melanogaster* w1118, инфицированных и не инфицированных патогенным штаммом *Wolbachia* wMelPop.

Во втором эксперименте аналогичные инфицированная и неинфицированная линии *D. melanogaster* содержались в инкубаторах при 25 °C и 29 °C. Схема эксперимента представлена на рисунке 7. Мухи в течение 24 ч. откладывали яйца в

12-ти пробирках со стандартным кормом при 25 °С, после чего мух удаляли из пробирок. Половина пробирок с отложенными яйцами переносилась на 29 °С, в то время как оставшаяся часть оставалась при 25 °С. Личинки 3-го возраста собирались на 5-ый и 7-ой дни развития при 25 °С и 29 °С. Вылетающие имаго переносились в новые пробирки с кормом на 9-ый день развития при 29 °С и на 11-ый день при 25 °С. Мозг взрослых мух выделялся на 1-ый, 3-ий, 7-ой и 13-ый дни после их вылета при обеих температурах.

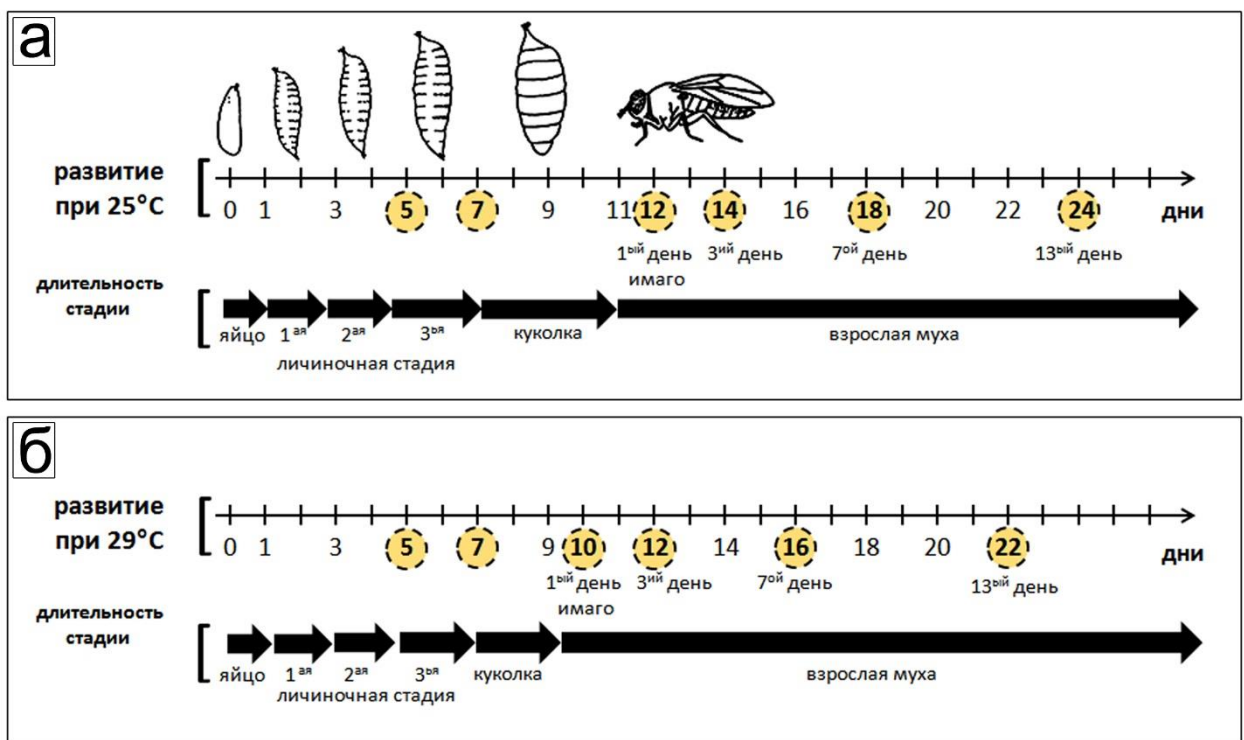


Рис. 7. Схема эксперимента по исследованию распределения бактерий *Wolbachia* штамма *wMelPop* в клетках мозга личинок 3-го возраста и взрослых мух *D. melanogaster w1118*, содержащихся при 25 °С и 29 °С с раннего эмбриогенеза. Пунктирными жёлтыми кругами обозначены точки фиксации для флуоресцентной гибридизации *in situ*.

## 2.2. Список использованных реактивов

25 % раствор глутарового альдегида (Fluka, Швейцария); натрия какодилат (Fluka, Швейцария); осмия тетраоксид (ОАО Аурат, Россия); уранилацетат (Serva, Германия); агар-100 (Agar Scientific, Англия); Ерон 812 (Serva, Германия); DDSA (Agar Scientific, UK); MNA (Agar Scientific, Великобритания); DMP-30 (Serva, Германия); метиленовый синий (Panreac, Испания); натрия тетрагидроборат (Реахим, СССР); нитрат свинца (Serva, Германия); цитрат натрия (Sigma, США); формвар (Agar Scientific, Англия); гидроксид натрия (Panreac, Испания); хлороформ (База №1 Химреактивов, Россия); ацетон (База №1 Химреактивов, Россия); этиловый спирт (База №1 Химреактивов, Россия); ледяная уксусная кислота (База №1 Химреактивов, Россия); трис(гидроксиметил)аминометана (Диаэм, Россия); этилендиаминтетрауксусная кислота (Медиген, Германия); формамид (Serva, Германия); лаурилсульфат натрия (Реахим, Россия); 4, 6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид (Sigma, США); среда для заливки (Thermo Scientific, США); хлористый натрий (Реахим, СССР); хлористый магний (ООО «Лаверна», Россия); хлористый калий (Реахим, СССР); агароза (Медиген, Германия); калий ферроцианат (Реахим, СССР); фосфатный буфер (Sigma, США); Таq ДНК полимеразы (Медиген, Германия); dNTP (Медиген, Германия); протеиназа К (Медиген, Германия); глицерин (Реахим, СССР); ксиленцианол (Реахим, СССР); изорпропанол (Реахим, СССР);

## 2.3. Молекулярно-биологические методы

### 2.3.1. Выделение геномной ДНК из дрозофилы

ДНК выделяли из целой мухи. Усыплённых эфиром насекомых гомогенизировали в 60 мкл STE буфера (0,1 М NaCl, 10 мМ Tris-HCl и 1 мМ EDTA,

pH 8.0) с добавлением SDS до конечной концентрации 1 %. Протеолиз проводили с использованием протеиназы К (в конечной концентрации 0,4 мг/мл) при температуре 56 °С в течение 3 ч. Затем, для инактивации протеиназы К, гомогенат прогревали при 95 °С в течение 10 мин. Для очистки ДНК от солей использовали метод её переосаждения в этиловом спирте. Для этого использовали смесь, которая состояла из ½V 7,5 М NH<sub>4</sub>Ac и 2V этилового спирта (96 %). После аккуратного перемешивания смеси и выдерживания в течение 30 мин., выделенную ДНК осаждали при 14000 об/мин и удаляли супернатант. Затем осадок ДНК промывали дважды 75 %-ным этиловым спиртом. Высушенный осадок растворяли в 30 мкл ddH<sub>2</sub>O. Образцы выделенной ДНК хранили при -20 °С.

### **2.3.2. Условия полимеразной цепной реакции для определения наличия бактерий в организме *D. melanogaster***

ПЦР проводили в объёме 20 мкл (0,1 нг геномной ДНК, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,25 мМ каждого dNTP, 0,5 мкМ каждого праймера, 50 мМ KCl, 10 мМ Tris-HCl, pH 9.0 и 1 е.а. *Taq* ДНК полимеразы). При амплификации проводили предварительную денатурацию ДНК (95 °С – 4 мин) с последующими 30 циклами реакций с определённым температурным профилем: 20 с. при 94 °С, 1 мин при 56 °С, 1 мин при 72 °С.

В работе использовали следующие комбинации праймеров:

1. *wsp* 81F (5' – TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC – 3')

*wsp* 691R (5' - AAAAATТАААСGСТАСТССА).

В ПЦР данные праймеры способны амплифицировать фрагменты *wsp* гена из различных штаммов *Wolbachia* (Braig *et al.*, 1998).

2. *16S pPHK* 45-61F (5' – GCTТААСАСАТGСАAG – 3')

*16S pPHK* 1242-1227R (5' – ССАТТGТАGСАСGТGТ – 3').

Данные праймеры способны инициировать синтез фрагментов генов, гомологичных бактериальной *16S pPHK* в ПЦР (O'Neill *et al.*, 1992).

3. *Drosophila 28S pPHK*. Праймеры использовали для тестирования выделения ДНК и эффективности прохождения реакции. Данные праймеры гомологичны к последовательности гена *28S pPHK* дрозофил.

### 2.3.3. Электрофорез ДНК в агарозном геле

Для электрофоретического разделения фрагментов ДНК использовали 1-1,5 %-ный агарозный гель, приготовленный на буфере TBE (40 мМ Tris-HCl, pH 8.0, 1 мМ EDTA, 0,01 мкг/мл бромистого этидия). Образцы, содержащие 0,3-0,5 мкг ДНК, наносили в карманы геля с добавлением 1/10 объёма буфера, содержащего 50 % глицерина, 0,3 % ксиленцианола. Электрофорез проводили в течение 30-60 мин при напряжении электрического поля 8 В/см. Визуализацию фрагментов ДНК осуществляли в ультрафиолетовом свете (254 нм).

### 2.3.4. Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля и определение их нуклеотидной последовательности

Фрагмент ДНК аккуратно вырезался из агарозного геля, затем в 0,2 мл пробирках проводилась реакция синтеза/терминации. Общая реакционная смесь содержала реактивы из набора для секвенирования BigDye 3.1 terminator (ABI Prism), праймер 81-*wsp* или 691-*wsp*, ДНК (продукт ПЦР), общим объёмом реакции 10 мкл. Для очистки ДНК от солей использовали метод её переосаждения в изопропиловом спирте. Для этого к 10 мкл реакционной смеси добавляли бидистиллированную воду и 100 % изопропанол до конечной концентрации 60 %. После перемешивания выделенную ДНК осаждали при 14000 об./мин. и супернатант удаляли. Затем осадок

ДНК промывали дважды 80 %-ным этиловым спиртом. Анализ секвенируемой последовательности был проведён в Центре коллективного пользования (Межинститутский центр секвенирования ДНК, ИЦиГ) на секвенаторе модели ABI310A (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer).

## **2.4. Электронная микроскопия**

### **2.4.1. Фиксация и заливка образцов мозга *D. melanogaster* для электронной микроскопии**

Образцы мозга самок *D. melanogaster w1118*, содержащихся при температурных режимах I, фиксировали на 3 день и день 50 % гибели мух (25 день) для 25 °С и на 3, 7 и 13 дни для 29 °С. Образцы мозга самок, содержащихся при температурных режимах II, фиксировали на 30 день их жизни при 16 °С после предварительной обработки повышенной температурой в течение 3, 7 и 13 дней. Образцы мозга *D. melanogaster w1118*, содержащихся постоянно при 16 °С использовали в качестве контроля, также фиксировали на 30 день жизни. Для фиксации были выбраны только самки, поскольку передача бактерий из поколения в поколение происходит по материнской линии.

Для выбора оптимальной фиксации образцов мозга мух был проведён сравнительный анализ трёх вариантов фиксаций, согласно протоколам представленным ранее (Meinertzhagen, 1995; Min, Benzer, 1997; Жукова и др., 2008). Согласно первому протоколу фиксацию образцов проводили 2,5 %-ным глутаровым альдегидом и 2,5 %-ным формальдегидом на Na-какодилатном буфере. Для второго типа фиксации использовали 1 %-ный глутаровый альдегид и 1 %-ный формальдегид (1:1) на том же буфере. Третий тип фиксации проводили с использованием 2,5 %-ного глутарового альдегида на том же буфере. По результатам электронно-



микроскопического анализа была выбрана оптимальная фиксация, которая подробно описана ниже.

Мозг мягко наркотизированных медицинским эфиром мух выделяли в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7.4). Для электронно-микроскопического анализа брали оптические доли мозга, а также центральный отдел. Ламина и сетчатка специально не выделялись. Фиксацию проводили в 2,5 %-ном растворе глутарового альдегида на 0,1 М Na-какодилатном буфере (рН 7.4) в течение 2-3 ч, после чего материал отмывали в трёх сменах 0,1 М Na-какодилатного буфера (рН 7.4). Образцы постфиксировали в 1 %-ном растворе тетраоксида осмия с добавлением 0,8 %-ного ферроцианата калия на том же буфере в течение 1 ч. После трёхкратного отмывания дистиллированной водой мозг оставляли на ночь в 1 %-ном водном растворе уранилацетата при температуре 4 °С в холодильнике. На следующий день образцы отмывали водой и обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации (по 10 мин в 30 %, 50 %, 70 %, 96 % и 100 %-ном растворах этанола соответственно). Затем мозг дополнительно обезвоживали в ацетоне (2 раза по 20 мин) и пропитывали смесью смолы, включающей 4 компонента (Epon 812, DDSA, MNA и DMP-30) по следующей схеме:

1 объём смолы : 3 объёма ацетона – 30 мин

1 объём смолы : 1 объём ацетона – 30 мин

3 объёма смолы : 1 объём ацетона – 2,5 ч

Чистая смола – 2 ч

Чистая смола – 12 ч при комнатной температуре.

Далее проводилась заливка образцов в формы и инкубация в течение ночи в эксикаторе с  $\text{CaCl}_2$  (для удаления пузырьков воздуха из смолы).

Для полимеризации образцы помещались в термостат на +60 °C на 3 сут.

#### **2.4.2. Получение, окрашивание и исследование полутонких и ультратонких срезов**

Полутонкие срезы толщиной 0,5 мкм, полученные при помощи стеклянного ножа на ультрамикротоме Ultracut Reichert-Jung (Австрия), переносили в каплю воды на предметное стекло и осторожно высушивали над пламенем спиртовки, не доводя до кипения. Окраску срезов проводили 1 %-ным раствором метиленового синего в 1 %-ном растворе тетрагидробората натрия, нагревая стекло над пламенем спиртовки. Затем срезы промывали дистиллированной водой и анализировали под световым микроскопом для выбора нужного участка будущих ультратонких срезов. Для наилучшего окрашивания в краску добавляли небольшое количество 1 М HCl, понижая значение pH до нормы.

Ультратонкие срезы толщиной 50-80 нм получали с помощью алмазного ножа (Diatome, Швейцария) на ультрамикротоме Leica Ultracut UCT (Австрия), после чего их снимали на медные сеточки, покрытые формварной плёнкой. Сеточки со срезами красили по стандартному протоколу двойного контрастирования 1 %-ным уранилацетатом и цитратом свинца. Окрашенные срезы исследовали с помощью электронного микроскопа JEOL JEM-100SX (Япония) при ускоряющем напряжении 60 или 80 кВ.

### **2.5. Конфокальная микроскопия**

#### **2.5.1. Фиксация и флуоресцентная гибридизация *in situ* образцов мозга *D. melanogaster***

Образцы мозга личинки 3-го возраста и взрослой мухи выделяли в 0,1 М фосфатном буфере с помощью тонких медицинских пинцетов под

стереомикроскопом. Выделенный материал сразу фиксировали в модифицированном фиксаторе Карнуа (6:3:1 v/v хлороформ:спирт:ледяная уксусная кислота) в течение 2-3 ч. После фиксации образцы отмывали 2 раза в 70 % спирте и проводили гибридизацию *in situ* в течение 2 ч при 46 °C в заранее подогретом и специфичном для флуоресцентной пробы буфере (0.9 М NaCl, 20 миллимоль Tris-HCl pH 8.0, 0.01 % w/v лаурилсульфат натрия [SDS], 20% или 30% v/v формамид и 1 мкмоль пробы). В данной работе использовались две пробы: EUB338 (5'-Cy3-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'), которая связывается с участком 16S рРНК, являющимся уникальным для большинства известных грамотрицательных бактерий (Amann *et al.*, 1990), и W2 (5'-Cy5-СТТСТGTGAGТАССGTCАТТАТC-3'), которая была специально создана для распознавания 16S рРНК бактерий *Wolbachia* (Heddi *et al.*, 1999). В гибридизационном буфере 30% v/v формамид использовался для пробы EUB338, а 20% - для пробы W2. После гибридизации *in situ* образцы отмывали в течение 15 мин при 48 °C в заранее подогретом буфере для отмывки (20 миллимоль Tris-HCl, 0.01 % лаурилсульфат натрия, 0.5 М ЭДТА, 0.1 М NaCl при использовании пробы EUB338, и 20 миллимоль Tris-HCl, 0.01 % лаурилсульфат натрия, 0.5 М ЭДТА, 0.2 М NaCl при использовании пробы W2) и окрашивали в течение 5 мин раствором фосфатного буфера, содержащим 1 мкг/мл 4, 6-диамидино-2-фенилиндола дигидрохлорида (DAPI). После этого образцы помещали на предметное стекло в каплю среды для заливки, закрывали покровным стеклом и запечатывали лаком по периметру стекла. Приготовленные препараты хранили в темноте при 4 °C до анализа с использованием лазерно-сканирующего конфокального микроскопа TCS SP5 (Leica, Австрия).

## **2.5.2. Подсчёт относительной плотности и количества бактерий *Wolbachia* в клетках мозга *D. melanogaster* с помощью программы ImageJ**

Измерение площади, занимаемой скоплениями бактерий, и подсчёт количества бактериальных клеток в ткани мозга *D. melanogaster* проводили с помощью программы ImageJ 1.46с (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

### **2.5.2.1. Измерение плотности бактерий относительно всей площади мозга**

Относительную плотность бактерий, распределённых по всей ткани мозга, оценивали путём деления площади, занимаемой бактериями на одном конфокальном срезе, измеренную с помощью программы ImageJ по изображению с флуоресцентным сигналом, на площадь всего мозга на этом же конфокальном срезе, измеренную тем же способом по изображению мозга в проходящем свете. Было проанализировано 3 образца мозга по 4 – 8 оптических срезов толщиной 7 мкм с каждого, полученных с помощью 10-ти кратного объектива.

Площадь всего мозга с одного конфокального среза измерялась с помощью ручного выделения контура мозга при предварительной корректировке масштаба анализируемого изображения. Площадь, занимаемая бактериями на одном конфокальном срезе, высчитывалась по следующему пути: изображения из формата RGB переводили в восьми битный формат «grayscale» или «градации серого», проводили инвертирование тёмных и светлых пикселей и далее переводили восьми битное изображения в однобитный формат с помощью функции «threshold» или «предел». Полученные «чёрные» точки или скопления точек, отражающие площадь бактерий, были измерены с помощью функции «measure» или «измерить».

### 2.5.2.2. Измерение количества бактерий в единичной клетке мозга

Для подсчёта количества бактерий на одну клетку мозга были использованы изображения полученные с помощью 63-х кратного объектива. Измерения проводили на 10 случайно выбранных клетках, содержащих бактерии, из разных отделов ЦНС личинок и мозга взрослых мух. Для каждой клетки анализировали по 4 – 6 оптических срезов толщиной 0,6 мкм. Для 10 случайных клеток из разных областей мозга, полностью забитых бактериями, мы анализировали 6 – 10 оптических срезов толщиной 0,6 мкм. Область клетки, содержащая бактерии, определяли по изображению с наложением флуоресцентных сигналов (DAPI для ядер и EUB338 для бактерий). Подсчёт бактерий проводили по изображению флуоресцентного сигнала *Wolbachia* (EUB338), переведённому в однобитный формат как описано выше. Количество бактерий определяли с помощью функции «analyze particles» или «проанализировать частицы» с заранее указанным размером единичной бактерии. Размер единичной бактериальной клетки определяли по среднему размеру 20 – 30 сигналов различных единичных бактерий на конфокальном срезе.

### 2.6. Статистические методы

Средние значения продолжительности жизни мух, содержавшихся при различных температурных режимах, сравнивали с помощью теста Стьюдента. Сравнение кривых выживаемости, построенных по методу Каплана-Майера, проводился с помощью лог-ранк теста, основой которого является Хи-квадрат тест. Тест Стьюдента также применяли для сравнения плотностей бактерий в клетках ЦНС личинок и мозге взрослых мух. Различия считались статистически значимыми

с вероятностью  $P < 0,05$ . Для определения нормальности распределения применяли тест Шапиро-Уилка.

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

#### 3.1. Молекулярно-биологический анализ инфицированности линий *w1118* и *w1118T D. melanogaster* бактериями *Wolbachia* штамма *wMelPop*

Для идентификации симбиотических бактерий в заражённой линии *D. melanogaster w1118*, был проведён анализ тотальной ДНК мух с помощью ПЦР с использованием праймера, специфичного локусу гена *wsp* (кодирует поверхностный белок оболочки) *Wolbachia*. При просмотре амплифицированных фрагментов ДНК инфицированных мух в агарозном геле выявлялись бэнды размером 610 п.н., характерные для гена *wsp* (Рис. 7, дорожки 6 – 9). Для получения неинфицированных *D. melanogaster (w1118T)* мухи в течение двух-трёх поколений содержались на корме с тетрациклином, который удаляет бактерии из цитоплазмы клеток хозяина (Hoffman *et al.*, 1986). Для незаражённой линии *D. melanogaster w1118T* бэнды выявлены не были (Рис. 7, Дорожки 2 – 5). Таким образом, мы установили, что линия мух *w1118* инфицирована *Wolbachia*, а *w1118T* не заражена бактериями.

Продукт ПЦР, полученный с использованием праймера, специфичного к ДНК локуса гена *wsp*, был выделен из геля, и использован для установления его нуклеотидной последовательности длиной 610 п.н. методом секвенирования (Рис. 8). С помощью программы BLAST, используя нуклеотидные последовательности баз данных NCBI, было проведено сравнение полученной последовательности. Проведённый анализ показал, что данная последовательность полностью гомологична последовательности гена *wsp* бактерий *Wolbachia*. Определение

генотипа бактерий в исследуемой нами линии *D. melanogaster* было проведено по фенотипическому эффекту эндосимбионта, проявляющемуся в резком снижении продолжительности жизни (ПЖ) мух при 29 °С по сравнению с ПЖ мух, содержащихся при 25 °С. Такое влияние на выживаемость хозяина характерно для *Wolbachia* штамма *wMelPop* (Min, Benzer, 1997).

### **3.2. Популяционный анализ продолжительности жизни и выживаемости линии *D. melanogaster*, не инфицированной и инфицированной *Wolbachia* штамма *wMelPop* при различных температурных режимах**

Согласно данным, полученным в лаборатории генетики популяций, постоянное содержание мух при 16 °С после временного их содержания при 29 °С, может частично нивелировать негативный эффект повышенной температуры и увеличивать ПЖ и выживаемость *D. melanogaster w1118*, как инфицированной, так и неинфицированной бактериями *Wolbachia* (Илинский Ю.Ю., неопубликованные данные). На основании вышеперечисленных данных, нами был поставлен эксперимент, схема которого приведена на рисунке 6 (см. Глава 2. Материалы и методы).

#### **3.2.1. Сравнительный анализ средней продолжительности жизни и выживаемости инфицированной и не инфицированной *Wolbachia* штамма *wMelPop* линий *D. melanogaster*, содержащихся постоянно при 25 °С, 29 °С и 16 °С**

Под средней продолжительностью жизни (ПЖ) понимается сумма ПЖ всех особей популяции, делённая на их общее количество, а под выживаемостью – доля выживших особей от общего числа на момент регистрации. В таблице 3 отражены полученные нами значения средней ПЖ самок и самцов инфицированной (*w1118*) и



неинфицированной (*w1118T*) линий мух при 25 °C, 29 °C и 16 °C. На рисунке 9 эти данные для наглядности представлены в виде графиков. При 25 °C средняя ПЖ неинфицированных самок и самцов составила  $50,6 \pm 2,0$  и  $52 \pm 1,6$  дней, соответственно, а у инфицированной линии она снизилась до  $32,6 \pm 2,6$  дней у самок и до  $34,8 \pm 2,5$  дней у самцов. Повышенная температура (29 °C) оказала негативное влияние на среднюю ПЖ как неинфицированной, так и инфицированной линии *D. melanogaster*. У содержащихся при 29 °C незаражённых самок и самцов ПЖ составила  $26,8 \pm 1,3$  и  $24,5 \pm 1,1$  дней, соответственно. У заражённых *Wolbachia* мух средняя ПЖ сократилась в 2,5 раза по сравнению с 25 °C и составила  $12,5 \pm 0,9$  дней у самок и  $13,2 \pm 0,6$  дней у самцов. Под действием пониженной температуры (16 °C), наоборот, произошло увеличение средней ПЖ мух, независимо от инфекционного статуса. У неинфицированных самок и самцов она достигла  $132,3 \pm 2,6$  и  $112 \pm 3,2$  дней, соответственно, а у инфицированных мух средняя ПЖ была немного ниже и составила  $103,8 \pm 5,6$  дней у самок и  $83,3 \pm 5,7$  дней у самцов. Интересно, что статистически значимые различия между средними ПЖ самок и самцов наблюдались лишь при пониженной температуре.

Результаты по анализу выживаемости линий *D. melanogaster* с разным инфекционным статусом при 25 °C, 29 °C и 16 °C представлены на рисунке 10. При всех трёх температурах выживаемость мух, заражённых *Wolbachia* штамма *wMelPop*, была ниже выживаемости неинфицированных с  $P < 0.001$  (Самки при 25 °C:  $\chi^2 = 110$ , d.f. = 1; при 29 °C:  $\chi^2 = 151$ , d.f. = 1; при 16 °C:  $\chi^2 = 117$ , d.f. = 1. Самцы при 25 °C:  $\chi^2 = 751$ , d.f. = 1; при 29 °C:  $\chi^2 = 240$ , d.f. = 1; при 16 °C:  $\chi^2 = 66$ , d.f. = 1). Следует отметить, что помимо инфекции, температура также влияла на выживаемость мух. Повышенная температура существенно снижала выживаемость

незаражённых мух (Самки при 25 °C/29 °C:  $\chi^2 = 270$ , d.f. = 1,  $P < 0.0001$ ; самцы при 25 °C/29 °C:  $\chi^2 = 407$ , d.f. = 1,  $P < 0.0001$ ), а пониженная значительно увеличивала её (Самки при 25 °C/16 °C:  $\chi^2 = 427$ , d.f. = 1,  $P < 0.0001$ ; самцы при 25 °C/16 °C:  $\chi^2 = 379$ , d.f. = 1,  $P < 0.0001$ ). Нами было установлено, что выживаемость самок и самцов не всегда одинакова при одинаковом температурном режиме. В случае с неинфицированными мухами самки и самцы одинаково реагировали на 25 °C ( $\chi^2 = 0.03$ , d.f. = 1,  $P < 0.8625$ ), а при 29 °C и 16 °C самки выживали лучше самцов ( $\chi^2 = 6.4$ , d.f. = 1,  $P < 0.0143$  и  $\chi^2 = 125$ , d.f. = 1,  $P < 0.0001$ , соответственно). Однако в случае с инфицированными мухами самки и самцы одинаково реагировали как на 25 °C, так и на 29 °C ( $\chi^2 = 0.02$ , d.f. = 1,  $P < 0.8822$  и  $\chi^2 = 3.7$ , d.f. = 1,  $P < 0.54$ , соответственно), но при 16 °C самки также выживали лучше самцов ( $\chi^2 = 13.8$ , d.f. = 1,  $P < 0.0002$ ).

Таким образом, увеличение температуры содержания с 16 °C до 29 °C приводит к снижению средней ПЖ и выживаемости как инфицированных, так и неинфицированных мух. Содержание при пониженной температуре приводит к увеличению средней ПЖ мух с разным инфекционным статусом. Необходимо отметить, что выживаемость самок при 16 °C была выше выживаемости самцов.

### **3.2.2. Сравнительный анализ средней продолжительности жизни и выживаемости инфицированной и не инфицированной *Wolbachia* штамма wMelPop линии *D. melanogaster*, при содержании мух в течение 3, 7 и 13 суток при повышенной температуре (29 °C) и последующем их переносе на пониженную температуру (16 °C)**

Тест на ПЖ заражённых и незаражённых wMelPop самок *D. melanogaster* w1118 проводился при 4 различных температурных режимах, обозначенных №1, 2, 3, 4. При режиме №1 мух постоянно содержали при 16 °C и полученные данные по их

ПЖ и выживаемости использовали в качестве контроля. При режимах №2, 3 и 4 мух обрабатывали повышенной температурой 29 °С в течение 3, 7 и 13 дней, соответственно, затем переносили на пониженную температуру (16 °С) до полной гибели насекомых. Средняя ПЖ незаражённых самок и самцов мух в условиях постоянного содержания при 16 °С составила  $132,3 \pm 2,6$  и  $112 \pm 3,2$  дней, соответственно (Табл. 4, Рис. 11). У инфицированных мух средняя ПЖ снизилась до  $103,8 \pm 5,6$  дней у самок и до  $83,3 \pm 5,7$  дней у самцов. В условиях температурного режима №2 средняя ПЖ неинфицированных самок и самцов мух сократилась до  $114,9 \pm 4,2$  и до  $101 \pm 4,9$  дней, соответственно. У инфицированных мух средняя ПЖ самок достоверно не отличалась от контроля и составила  $96,7 \pm 5,3$  дней, а у самцов снизилась на 15 % по сравнению с инфицированным контролем, составив  $71,6 \pm 3,3$  дня. При режиме №3 воздействие на среднюю ПЖ незараженных мух не оказалось существеннее, чем при режиме №2. Средняя ПЖ самок и самцов мух составила  $123,8 \pm 4,9$  и  $98,3 \pm 3,7$  дня, соответственно. Однако, у инфицированных мух она сократилась до  $72,1 \pm 4,5$  дней у самок и  $62,4 \pm 3,9$  дней у самцов. По сравнению с двумя предыдущими режимами, тринадцать дней содержания при повышенной температуре (Режим №4) оказали более существенное влияние на среднюю ПЖ незаражённых самок и самцов, которая составила, соответственно,  $77,0 \pm 7,7$  и  $75,2 \pm 5,6$  дней. У инфицированных мух наблюдается резкое снижение средней ПЖ на 75 % у самок ( $28,1 \pm 4,0$  дней) и 85% у самцов ( $13,2 \pm 1,1$ ) по сравнению с контролем.

Данные, полученные по выживаемости самок *D. melanogaster* при различных температурных режимах (Рис. 12), были разбиты на две группы. Первую группу использовали для сравнения выживаемости заражённых и незаражённых мух в равных условиях их содержания, чтобы оценить влияние инфекции на организм

хозяина. Вторая группа использовалась для сравнения выживаемости только неинфицированных мух, чтобы выявить действие различных температурных режимов. По данным из первой группы выживаемость инфицированных самок мух была достоверно ниже выживаемости неинфицированных при всех температурных режимах (Режим №1:  $X^2 = 117$ , d.f. = 1,  $P < 0.0001$ ; Режим №2:  $X^2 = 75$ , d.f. = 1,  $P < 0.0001$ ; Режим №3:  $X^2 = 194$ , d.f. = 1,  $P < 0.0001$ ; Режим №4:  $X^2 = 147$ , d.f. = 1,  $P < 0.0001$ ). Аналогичная ситуация наблюдалась для самцов мух (Режим №1:  $X^2 = 66$ , d.f. = 1,  $P < 0.0001$ ; Режим №2:  $X^2 = 96$ , d.f. = 1,  $P < 0.0001$ ; Режим №3:  $X^2 = 176$ , d.f. = 1,  $P < 0.0001$ ; Режим №4:  $X^2 = 202$ , d.f. = 1,  $P < 0.0001$ ). По данным из второй группы, по сравнению с контролем, обработка повышенной температурой оказывала действие на самок мух только в случае содержания их при режиме №3 и №4 (Режим №3:  $X^2 = 11$ , d.f. = 1,  $P < 0.004$ ; Режим №4:  $X^2 = 220$ , d.f. = 1,  $P < 0.0001$ ), а при режиме №2 воздействие 29 °C было статистически незначимым ( $X^2 = 0.35$ , d.f. = 1,  $P < 0.84$ ). В случае с самцами мух повышенная температура существенно влияла при всех трёх режимах (Режим №2:  $X^2 = 12.9$ , d.f. = 1,  $P < 0.0003$ ; Режим №3:  $X^2 = 64$ , d.f. = 1,  $P < 0.0001$ ; Режим №4:  $X^2 = 201$ , d.f. = 1,  $P < 0.0001$ ). При всех четырёх температурных режимах выживаемость самок мух была выше выживаемости самцов независимо от инфекционного статуса: для незаражённых мух – Режим №1:  $X^2 = 151$ , d.f. = 1,  $P < 0.0001$ ; Режим №2:  $X^2 = 69$ , d.f. = 1,  $P < 0.0001$ ; Режим №3:  $X^2 = 65$ , d.f. = 1,  $P < 0.0001$ ; Режим №4:  $X^2 = 17$ , d.f. = 1,  $P < 0.0001$ ; для заражённых мух – Режим №1:  $X^2 = 13.8$ , d.f. = 1,  $P < 0.0001$ ; Режим №2:  $X^2 = 57$ , d.f. = 1,  $P < 0.0001$ ; Режим №3:  $X^2 = 12.6$ , d.f. = 1,  $P < 0.0001$ ; Режим №4:  $X^2 = 61$ , d.f. = 1,  $P < 0.0001$ ).

Таким образом, проведённые популяционные исследования ПЖ и выживаемости *D. melanogaster* показали, что перенос с повышенной на пониженную

температуру действительно способствует восстановлению ПЖ как инфицированных, так и неинфицированных мух, однако этот эффект пропадает после длительного (более 7 дней) содержания при 29°C. Для понимания причин такого влияния *Wolbachia* штамма wMelPop на организм хозяина были проведены электронно-микроскопические исследования ультраструктуры и распределения бактерий в клетках мозга *D. melanogaster*. Выбор ткани был обоснован особенностью исследуемого штамма *Wolbachia* wMelPop активнее всего пролиферировать в клетках мозга своего хозяина (Min, Benzer, 1997).

### **3.3. Исследование структурной организации и распределения симбиотических бактерий *Wolbachia* в клетках мозга *D. melanogaster* при различных температурных режимах с помощью электронной микроскопии**

Как уже упоминалось выше (см. главу 1.2.3.3) штамм *Wolbachia* wMelPop, помимо клеток репродуктивных органов, мышц и сетчатки, локализуется в клетках мозга *D. melanogaster* (Min, Benzer, 1997). Поскольку мозг является одним из самых важных органов для жизнедеятельности организма, можно было предположить, что активная пролиферация бактерий именно в мозговой ткани является основной причиной ранней гибели мух. В задачу нашего исследования входило изучение морфологии и распределения бактерий в клетках мозга *D. melanogaster* при различных температурных режимах.

#### **3.3.1. Морфология клеток мозга самок *D. melanogaster***

Одной из первоначальных задач настоящей работы было изучение ультраструктуры мозга *D. melanogaster*. Для этого нам было необходимо отработать фиксацию ткани мозга мух для электронной микроскопии. Сравнительный анализ

результатов трёх различных фиксаций (Рис. 13) (см. главу Материалы и методы) показал, что фиксация с использованием 2,5 %-ного глутарового альдегида на 0,1 М Na-какодилатном буфере является наиболее оптимальной, поскольку сохраняет целостность органелл в цитоплазме и не нарушает строения их мембран (Рис. 13 в).

В ткани мозга взрослых *D. melanogaster* выделяют центральный комплекс, включающий в себя антеннальные доли и грибовидные тела, а также оптические доли, ламину и сетчатку (Рис. 14 а). При анализе под световым микроскопом срезов мозга, окрашенных метиленовым синим, были выявлены части мозга, аналогичные представленной схеме, а также было обнаружено, что клетки мозга располагаются в основном по периферии, а центральная часть ткани заполнена их отростками – дендритами и аксонами (Рис. 14 б). Более тонкое исследование с помощью электронного микроскопа позволило установить, что оболочка мозга имеет гомогенное светлое содержимое и толщину на срезах от 10 до 30 мкм. Тела нейронов и клетки глии формируют слой, лежащий непосредственно под оболочкой мозга (Рис. 14 в, г). Далее, ближе к центру, располагается нейропилль, которая представляет сплетение отростков нервных клеток или (дендритов и аксонов) (Рис. 14 в, г), а также клеток глии (см. ниже). Рисунки 15-18 демонстрируют морфологию нейронов, клеток глии и неропили, которые являются основными составляющими ткани мозга мух.

В теле каждого нейрона располагается крупное овальное или вытянутое ядро с небольшими инвагинациями ядерной оболочки (Рис. 15). В ядрах нейронов выявляется, как правило, одно, реже два ядрышка (Рис. 15 б, в) и иногда небольшие компактные глыбки хроматина. Компоненты гладкого ЭПР представлены одиночными мембранами и пузырьками (Рис. 15 в), в то время как шероховатый ЭПР

формирует крупные скопления параллельных цистерн (Рис. 16 а). Тела нейронов содержат хорошо развитый аппарат Гольджи (Рис. 16 б). В цитоплазме часто встречаются специфические мелкие нейросекреторные гранулы (Рис. 15 б, в и Рис. 16 б). Миелиновые оболочки разной толщины хорошо видны на поперечных срезах аксонов (Рис. 16 а) и иногда вокруг тел нейронов (Рис. 16 в). Цитоплазма клеток содержит типичные митохондрии с хорошо различимыми узкими кристами (Рис. 16 г, д).

Клетки глии, как известно, обеспечивают трофическую, транспортную и опорную функции, необходимые для работы нейронов (Meyer-Franke *et al.*, 1995). Эти клетки имеют, как правило, звёздчатую форму и часто располагаются между нейронами, с которыми они тесно контактируют (Рис. 17 а – в). По сравнению с нейронами, ядра клеток глии содержат более компактные и крупные глыбки хроматина (Рис. 17 г). Необходимо отметить, что иногда в ядрах клеток глии обнаруживались регулярно расположенные вирусные частицы, тогда как в нейронах их обнаружено не было (Рис. 17 г, д). Тесные контакты клеток глии с оболочками аксонов нейронов связаны с процессом формирования миелиновой оболочки, в образовании которой они, как известно, принимают участие (Рис. 17 е).

Нейроны и клетки глии составляют лишь небольшую часть мозга *D. melanogaster*. Основную его массу формируют нейропили, занимающие центральные области (Рис. 18 а). На срезе нейропили можно видеть множество тесно контактирующих аксонов и дендритов (Рис. 18 б). В цитоплазме аксонов часто обнаруживаются митохондрии.

### 3.3.2. Ультраструктура и распределение *Wolbachia* в клетках мозга самок *D. melanogaster*, содержащихся при 25 °С

При умеренной температуре (25 °С) в клетках мозга *D. melanogaster w1118* встречались типичные бактерии *Wolbachia* коккоидной или палочковидной формы со средним диаметром около 1 мкм, окружённые трёхслойной оболочкой, в которой различались две внутренние мембраны бактерий (клеточная стенка) и внешнюю мембрану хозяйского происхождения (Рис. 19 а, б). *Wolbachia* содержали большое количество рибосом и центрально расположенный дисперсный хроматин. Интересно, что в клетках присутствовали бактерии с тёмным и светлым матриксом (Рис. 19 в), а также наблюдался тесный контакт между наружными мембранами оболочек бактерий. В клетках выявлялись делящиеся *Wolbachia*, что свидетельствовало о нормальной функциональной активности бактерий (Рис. 19 г).

Общий качественный электронно-микроскопический анализ показал, что бактерии *Wolbachia* встречаются в основном в нейронах (Рис. 20 а – в) и клетках глии (Рис 20 в), а также иногда в межклеточном пространстве (Рис. 20 д) ткани мозга *D. melanogaster*. На срезах аксонов и дендритов бактерий обнаружено не было. Следует отметить, что плотность бактерий в цитоплазме тел нейронов сильно варьировала от 1-50 эндосимбионтов на клетку до больших скоплений, часто заполняющих всю цитоплазму нескольких близлежащих клеток. Рисунок 20 а – в демонстрирует три типа нейронов: первый тип – нейроны с низким содержанием *Wolbachia* (от 1 до 10 бактерий на срез тела нейрона); второй тип – нейроны со средней плотностью бактерий (10 – 50 бактерий на срезе тела нейрона) и третий тип – нейроны с максимальной плотностью бактерий (более 50 бактерий на срез тела нейрона) в цитоплазме. Иногда большие скопления *Wolbachia* могли занимать всю



цитоплазму нескольких близлежащих нейронов. В клетках глии (Рис 20 г) число бактерий также варьировало, однако такой высокой плотности *Wolbachia*, как в телах нейронов третьего типа, в них обнаружено не было. При нормальной температуре содержания мух (25 °С) в ткани мозга наиболее часто встречался второй тип нейронов. Наряду с этим изредка выявлялись заполненные *Wolbachia* тела нейронов (третий тип распределения). Характер распределения бактерий в клетках мозга оптических долей и центрального отдела не различался.

### **3.3.3. Ультраструктура и распределение *Wolbachia* в ткани мозга самок *D. melanogaster*, содержащихся при повышенной температуре (29 °С)**

Эксперимент по воздействию повышенной температуры на мух, проводимый в данной работе, включал в себя несколько точек фиксации ткани мозга для электронной микроскопии. Это точки были взяты на основании результатов популяционного анализа выживаемости самок при их постоянном содержании при 29 °С. Первую фиксацию проводили на 3-й день содержания, поскольку заметных изменений в выживаемости мух до этого периода не наблюдалось. Вторую фиксацию выполняли на 7-ой день, когда начиналась гибель самок, а последнюю фиксацию проводили на 13-ый день, когда ~ 50 % особей в популяции погибло. Таким образом, выбранные точки фиксации позволили определить, что происходит с клетками мозга и бактериями на разных этапах динамики популяции мух.

После 3-х дней воздействия повышенной температуры ультраструктура клеток мозга не отличалась от таковой при 25 °С (Рис. 21 а, б). Как и при 25 °С, чаще встречались нейроны второго типа (Рис. 21 в). Распределение бактерий в клетках глии было также аналогичным контролю (Рис. 21 г). При содержании самок при повышенной температуре в течение 7-ми дней морфология нейронов и клеток глии

не изменялась по сравнению с контролем (Рис. 22 а, б). Чаше наблюдались большие скопления бактерий, заполняющие пространство нескольких близлежащих клеток мозга (третий тип нейронов) (Рис. 22 в). Встречалось также множество нейронов второго типа и редко первого типа. Необходимо отметить, что иногда среди большого скопления бактерий выявлялись палочковидные электронно-плотные структуры, напоминающие разрушающиеся бактерии (Рис. 22 г). На 13-ый день воздействия 29 °С, при сохранении ультраструктуры клеток мозга, в них наблюдались многочисленные крупные скопления *Wolbachia* (Рис. 22 д), и часто встречались довольно большие агрегаты электронно-плотных структур (Рис. 22 е).

Таким образом, увеличение времени содержания самок при повышенной температуре вызывало формирование большого количества электронно-плотных структур, напоминающих деградирующие бактерии. Ультраструктура клеток мух сохранялась при всех исследованных температурных режимах.

### **3.3.4. Исследование ультраструктуры и распределения *Wolbachia* в ткани мозга *D. melanogaster* при пониженной температуре (16 °С)**

Электронно-микроскопический анализ контрольной линии мух, содержащейся постоянно при 16 °С показал, что на протяжении 30 дней морфология нейронов и клеток глии не нарушается (Рис. 23 а, б). Ультраструктура бактерий и их распределение в клетках мозга существенно не менялись по сравнению с контролем при 25 °С (Рис. 23 в, г). В ткани мозга встречались в основном нейроны первого и второго типа. Редко выявлялись большие скопления бактерий. Иногда среди типичных бактерий встречались *Wolbachia*, лежащие под общей наружной мембраной (Рис. 23 в). В клетках глии плотность бактерий не варьировала и составляла не более 1 – 10 бактерий на клетку (Рис. 23 г).

### 3.3.5. Распределение *Wolbachia* в клетках мозга *D. melanogaster* при содержании мух на повышенной температуре (29 °C) и последующем их переносе на пониженную (16 °C) температуру

Согласно данным популяционного анализа, на 30 день содержания инфицированных мух при 16 °C без воздействия повышенной температуры погибал лишь 1 % особей. На 30-ый день при этой же температуре после 3 дней воздействия 29 °C гибли 2 % мух. После 7 дней воздействия повышенной температурой и переноса на 16 °C, на 30-ый день погибало уже около 10% насекомых, а после 13 дней – более половины (60%). Подобная динамика выживаемости мух обусловила выбор точки фиксации (30 день) образцов мозга для электронной микроскопии.

Ультраструктура клеток мозга *D. melanogaster* после 3 дней содержания при повышенной температуре не изменялась по сравнению с контролем (постоянное содержание при 16°C) (Рис. 24 а, б). Титр бактерий в клетках мозга, преимущественно в нейронах, немного увеличивался. Часто встречались нейроны второго типа, и снижалось количество нейронов первого типа. Бактерии образовывали плотные скопления, занимающие иногда пространство нескольких клеток (Рис. 24 в). В клетках глии плотность *Wolbachia* оставалась неизменной по сравнению с контролем (Рис. 24 г).

После 7 дней содержания мух при 29 °C ультраструктура нейронов и клеток глии не отличалась от контроля (Рис. 25 а, б). Увеличение количества *Wolbachia* происходило как в телах нейронов, так и глии (Рис. 25 в, г). Бактерии в телах нейронов формировали плотные скопления, занимающие пространство нескольких близлежащих клеток. На границе скоплений иногда выявлялись расширенные межклеточные полости, образующиеся, возможно, в результате разрушения клеток

мозга вследствие активной пролиферации бактерий (Рис. 25 в). В этих участках иногда наблюдались *Wolbachia*. В клетках глии количество бактерий варьировало от 1 до 15 и больших скоплений не обнаруживалось (Рис. 25 г). В телах нейронов помимо типичных бактерий *Wolbachia* со светлым матриксом, нами были обнаружены электронно-плотные структуры с тройной оболочкой, напоминающие деградирующие бактерии (Рис. 25 д).

При содержании мух в течение 13 дней при повышенной температуре и последующем их переносе на 16 °С ультраструктура клеток мозга почти не изменялась (Рис. 26 а, б), хотя в ядрах нейронов появлялись многочисленные глыбки компактного хроматина (Рис. 26 а). Бактерии образовывали большие скопления, занимающие пространство нескольких клеток, в основном нейронов (Рис. 26 в). Помимо типичных скоплений бактерий, часто встречались крупные скопления электронно-плотных структур, которые обнаруживались также под оболочкой мозга *D. melanogaster* (Рис. 26 г, д). Кроме того, в этой области выявлялись многочисленные фрагменты разрушенных клеток.

Таким образом, проведённые исследования подтвердили, что выявленный с помощью популяционного эксперимента период содержания мух при 29 °С (7 – 13 дней) является критическим. После 7-ми дней воздействия повышенной температуры к 30-му дню содержания мух при 16 °С увеличивалось число больших скоплений бактерий (нейронов третьего типа), а после 13-ти дней воздействия выявлялись крупные агрегаты электронно-плотных структур, предположительно деградирующих бактерий, выходящих под оболочку мозга.

### 3.3.6. Гетерогенность морфологических типов бактерий и частота их встречаемости в клетках мозга мух, содержащихся при различных температурных режимах

Электронно-микроскопический анализ показал, что различные температурные режимы содержания *D. melanogaster* способствуют изменению морфологии бактерий *Wolbachia*, по-разному реагирующих на меняющиеся условия среды. На рисунке 27 представлены фотографии разнообразных морфологических типов *Wolbachia* с нарушениями типичного строения, наблюдаемые в клетках мозга при различных температурных режимах содержания. Они включают: бактерии с расширенным вакуолеподобным пространством между клеточной стенкой и наружной плазматической мембраной (Рис. 27 а, б); *Wolbachia* с везикуляцией мембран (Рис. 27 в); бактерии с темным матриксом, окруженные несколькими мембранами (Рис. 27 г), а также очень крупные *Wolbachia* со светлым матриксом (Рис. 27 д); увеличенные в длину бактерии атипичной формы, иногда лежащие под общей мембраной с делящейся бактерией (Рис. 27 е); группы бактерий, окруженные общей наружной мембраной (Рис. 27 ж), а также *Wolbachia* с выпячиванием клеточной оболочки (Рис 27 з).

Помимо разнообразных морфологических типов функционирующих бактерий, из полученного материала мы выделили ряд их деградирующих форм. К ним можно отнести бактерии, которые были окружены множеством мембран и имели существенные нарушения в структуре (Рис. 28 а), бактерии с гомогенным матриксом и нарушенной целостностью оболочки (Рис. 28 б, в). Иногда встречались разрушающиеся *Wolbachia* внутри крупной вакуоли (Рис. 28 г). Одной из распространённых деградирующих форм являлись электронно-плотные

бактериоподобные формы, которые обнаруживались или в скоплениях (Рис. 28 д), или поодиночке (Рис. 28 е). Мы их отнесли к бактериям из-за их сходства с *Wolbachia* по наличию трёх-слойной оболочки и их локализации в скоплениях бактерий. Выявлялись бактерии с уплотнением матрикса в центре (Рис. 28 ж), или бактерии контактирующие с плотным тельцем (Рис. 28 з). Отмечались *Wolbachia* с разреженным матриксом (Рис. 28 и). Встречались бактерии с электронно-плотной внешней мембраной (Рис. 28 к), а также с участками плотного матрикса, расположенного дисперсно по всей клетке (Рис. 28 л).

Анализ организации перечисленных выше деградирующих форм позволил выделить переходные формы бактерий в процессе последовательного изменения их морфологии и структуры (Рис. 29). Под буквами *a-e* на рисунке 29 перечислены одиночные переходные формы бактерий в процессе их превращения в палочковидные электронно-плотные формирования. В самом начале происходит мелкое одиночное уплотнение (Рис. 29 а), затем формируются множественные электронно-плотные участки (Рис. 29 б). Далее происходит постепенное сужение клетки и образование палочковидной электронно-плотной структуры (Рис. 29 в-д). Финальной стадией является формирование вакуоли вокруг электронно-плотного тельца (Рис. 29 е). Под буквами *ж-и* на рисунке 29 представлены переходные изменения, происходящие с группой бактерий, лежащих под общей мембраной. Сначала структуры бактерий ещё хорошо различимы (Рис. 29 ж), затем происходит их постепенная деградация путём лизиса (Рис. 29 з), оболочки разрушаются, клетки сжимаются, и в итоге образуются электронно-плотные скопления (Рис. 29 и).

На основании результатов исследования изменений морфологии бактерий и клеток мозга, для более наглядной демонстрации влияния температур на

ультраструктуру клеток мозга и бактерий по результатам качественного наблюдения нами были составлены две итоговые таблицы. В таблице 5 представлены данные о встречаемости разрушенных клеток и распределении *Wolbachia* в ткани мозга *D. melanogaster w1118* при различных температурных режимах. Таблица 6 описывает присутствие делящихся эндосимбионтов, бактерий на разных стадиях деградации и разрушенных бактерий в клетках мозга мух, содержащихся при различных температурных условиях.

Таким образом, при содержании мух при 25 °С бактерии присутствовали преимущественно в телах нейронов, расположенных на периферии оптических долей и центрального отдела мозга мух. Нейроны отличались по плотности распределения эндосимбионтов. Встречались клетки с низкой, средней и высокой плотностью расположения бактерий в цитоплазме нейронов. *Wolbachia* также обнаруживались в клетках глии и межклеточном пространстве под оболочкой мозга. Содержание самок при 29 °С приводило к увеличению титра бактерий в цитоплазме клеток мозга, однако картина распределения *Wolbachia* по этим клеткам сохранялась. К 13-му дню содержания мух при повышенной температуре ультраструктура нейронов немного изменялась, появлялись глыбки гетерохроматина в их ядрах. При длительном воздействии повышенной температуры на мух происходило увеличение количества электронно-плотных палочковидных структур, лежащих в больших скоплениях бактерий, что особенно отмечалось на 13-ый день. Нами были выделены различные деградирующие формы бактерий, а также предложены возможные пути их формирования (см. приложение, рис. 28, 29). При кратковременном (до 3-х дней) воздействии 29 °С на мух и последующем их переносе на 16 °С отмечалось увеличение ПЖ. При этом

морфология бактерий и их распределение оставалась неизменным по сравнению с контролем при 16 °С. Воздействие же повышенной температуры в течение 7 – 13 дней и последующем переносе мух на 16 °С приводило к появлению электронно-плотных структур и выходу их скоплений под оболочку мозга, происходящему после 13-ти дней содержания насекомых при 29 °С.

### **3.4. Распределение симбиотических бактерий *Wolbachia* в клетках мозга *D. melanogaster* на разных стадиях жизненного цикла при 25 °С и 29 °С, исследованное с помощью конфокальной микроскопии**

Флуоресцентная гибридизация *in situ* является современным, широко распространённым и надёжным методом визуализации симбионтов в тканях органов животных. С помощью него можно получить точные данные о распределении бактерий в том или ином органе хозяина.

#### **3.4.1. Детекция *Wolbachia* штамма wMelPop в клетках центральной нервной системы *D. melanogaster***

Анализ центральной нервной системы (ЦНС) личинок 3-го возраста выполнялся с помощью тотальной флуоресцентной гибридизации *in situ* на 5-ый и 7-ой дни развития при 25 °С и 29 °С. Ткань мозга взрослых самок (надглоточный и подглоточный ганглии) была проанализирована на 1-ый, 3-ий, 7-ой и 13-ый дни после вылета имаго (см. Материалы и методы, Рис. 7).

Для выявления бактерий *Wolbachia* в ткани мозга самок *D. melanogaster* w1118 мы проводили тотальную флуоресцентную гибридизацию *in situ* с использованием бактериоспецифичной пробы EUB338. Для проверки правильного связывания пробы были поставлены отрицательные контроли (Рис. 30). Ни в одном из отрицательных контролей специфического сигнала выявлено не было (Рис. 30 б, в).



Для проверки присутствия других кроме *Wolbachia* видов бактерий в организме мух, мы провели двойную флуоресцентную гибридизацию *in situ*, с использованием *Wolbachia* специфичной пробы и пробы EUB338 (Рис. 31). Наложение полученных сигналов свидетельствует об отсутствии других видов бактерий в исследуемой линии *D. melanogaster*.

### **3.4.2. Распределение и титр бактерий *Wolbachia* в клетках центральной нервной системы личинок 3-го возраста *D. melanogaster* при 25 °С и 29 °С**

После предварительного исследования локализации *Wolbachia* в ткани мозга мух с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* было установлено, что нервные клетки существенно отличаются по плотности бактерий. Для более точного сравнительного анализа этого параметра в ЦНС личинок и взрослых *D. melanogaster*, содержащихся при 25 °С или 29 °С, клетки мозга были условно разделены (аналогично тому, как это было сделано для электронной микроскопии) на три типа, на основании плотности *Wolbachia* в клетках (Рис. 32): первый тип – клетки, содержащие 1–10 бактерий на конфокальный срез клетки (Рис. 32 а – г); второй тип – клетки, содержащие 10 – 200 бактерий на конфокальный срез клетки (Рис. 32 д – з), причём бактерии часто локализовались на одной стороне клетки в виде шапочки; третий тип – клетки, содержащие 200–10000 бактерий на конфокальный срез нескольких клеток, цитоплазма которых полностью забита *Wolbachia* (Рис. 32 и – м).

ЦНС личинок 3-го возраста разделяется на две основные части: брюшной нервной ствол (БНС), представленный сетью билатерально симметричных сегментов (нейромеров) и мозг, состоящий из двух сферических долей, по краям которых располагаются зачатки оптических долей (Рис. 33 а) (Truman, 1990). Мозг личинки соединяется с БНС посредством подглоточного ганглия и представляет

собой две (Nichols, 2006). Нейробласты ЦНС личинки, предшественники нейронов и клеток глии, располагаются в основном в центральном мозге, подглоточном ганглии и в центре сегментов БНС.

Локализация *Wolbachia* в ЦНС личинок третьего поколения на 5-ый день развития при 25 °С (Рис. 34 а) была сходной с локализацией бактерий при 29 °С (Рис. 34 б). Большое количество клеток ЦНС было свободно от бактерий. Остальные клетки относились к первому и второму типу по плотности бактерий, присутствующих в их цитоплазме. В центре сегментов БНС, подглоточном ганглии и центральном мозге выявлялись в основном клетки мозга второго типа, содержащие от 10 до 200 бактерий на конфокальный срез, хотя встречались также клетки мозга первого типа (1-10 бактерий на конфокальный срез). На краях сегментов и в зачатках оптических долей были обнаружены клетки мозга только первого типа, причём количество клеток с бактериями было невелико (~ 5 – 10 %). Необходимо заметить, что локализация флуоресцентной метки в области центральных сегментов БНС, совпадала с распределением в них нейробластов.

На 7-ой день развития как при 25 °С (Рис. 35 а), так и при 29 °С (Рис. 35 б) характер распределения *Wolbachia* в ЦНС личинок третьего поколения существенно не изменялся по сравнению с 5-ым днём. Бактерии практически отсутствовали в большинстве клеток зачатков оптических долей и локализовались преимущественно в центральных сегментах БНС, подглоточном ганглии и центральном мозге. Следует отметить, что титр *Wolbachia* в клетках последних перечисленных областях был немного увеличен при 29 °С по сравнению с контролем при 25 °С. Это выяснилось при анализе динамики отличающихся по плотности бактерий клеток в разных областях ЦНС личинок 3-го возраста (см. рис. 36). Для этого исследования были

выбраны определённые области, отмеченные на рисунке 37. Полученные результаты показали, что при обоих температурных режимах большинство клеток центральных сегментов БНС, подглоточного ганглия и центрального мозга содержало 10 – 200 бактерий на конфокальный срез, тогда как в зачатках оптических долей преобладающими были клетки первой группы (1 – 10 бактерий на конфокальный срез). Различий в титре бактерий в клетках мозга личинок на 5-ый и на 7-ой день развития не было обнаружено при обеих температурах. Стоит отметить, что при 29 °С увеличение плотности *Wolbachia* произошло лишь в клетках центрального мозга. В остальных областях мозга титр бактерий в клетках не отличался от такового при 25 °С. Третья группа клеток, содержащая 200 – 10000 бактерий на конфокальный срез, в ЦНС личинок 3-го возраста выявлена не была.

### **3.4.3. Распределение и титр бактерий *Wolbachia* в клетках мозга взрослых мух при 25 °С и 29 °С**

Становление ЦНС взрослой мухи происходит в результате метаморфоза ЦНС личинки во время стадии куколки, когда происходит гибель группы нейронов БНС и сужение участка, соединяющего подглоточный ганглий и грудные сегменты (Рис. 33 б). Части ЦНС взрослых мух подробно описаны нами ранее (раздел 1.3.1). В данной работе у взрослых мух анализировалась только ткань мозга. Клетки БНС взрослых мух в перечень объектов нашего исследования не входили. На 1-ый день после вылета имаго при 25 °С бактерии *Wolbachia* были локализованы в основном в подглоточном и надглоточном (верхний протоцеребрум, антеннальные доли и оптические доли) ганглиях мозга мух и имели наименьшую плотность в оптических долях (Рис. 38 а). Наиболее часто встречались нервные клетки второй группы, содержащие 10 – 200 бактерий в цитоплазме. Клетки первой группы преобладали

в ламине и сетчатке. Более половины клеток мозга не содержали бактерий в цитоплазме. На 1-ый день после вылета имаго при 29 °С общая картина распределения *Wolbachia* по разным областям мозга мух сохранялась, но при этом резко возрастала плотность бактерий по сравнению с 25 °С (Рис. 38 б). Особенно это заметно в районе подглоточного и надглоточного ганглиев. В этих областях мозга, помимо первой и второй, выявлялись клетки мозга третьей группы, забитые бактериями. Однако в ламине и сетчатке существенных изменений в титре бактерий обнаружено не было. На 3-ий день после вылета имаго как при 25 °С, так и при 29 °С распределение *Wolbachia* сохранялось, а плотность немного увеличивалась, причём для 29 °С это было более выражено (Рис. 39 а, б). На 7-ой день после вылета имаго разница между плотностью бактерий при 25 °С и при 29 °С становилась более заметной, хотя картина распределения бактерий сохранялась (Рис. 40 а, б). В ламине при 29 °С выявлялись крупные скопления бактерий (Рис. 40 б). К 13-ому дню титр *Wolbachia* в ткани мозга мух, содержащихся при 25 °С, существенно не возрастал (Рис. 41 а), а при 29 °С к 13-ому дню бактерии активно пролиферировали и заполняли практически всё пространство нервных клеток в области поглоточного и надглоточного ганглиев, а также ламины и сетчатки мозга мух (Рис. 41 б).

Нами была проанализирована динамика групп титров бактерий в клетках мозга взрослых мух при 25 °С и 29 °С на 1-ый, 3-ий, 7-ой и 13-ый дни после вылета имаго. Были исследованы одинаковые по площади участки во всех областях мозга, отмеченных на рисунке 42. При обеих температурах было выявлено снижение процентного соотношения первой группы клеток (1 – 10 бактерий на конфокальный срез клетки) и увеличение процентного соотношения второй и третьей групп клеток для подглоточного ганглия, антеннальной доли, верхнего протоцеребрума,

оптической доли и ламины (Рис. 43). Динамика плотности *Wolbachia* была более выраженной при 29 °С, о чём свидетельствует увеличение количества клеток третьей группы к 13-ому дню. Сетчатка являлась единственной областью, где существенных изменений в титре бактерий не происходило, и превалировала первая группа клеток, кроме небольшого увеличения количества второй группы клеток на 13-ый день при 29 °С.

#### **3.4.4. Сравнительный анализ плотности *Wolbachia* в центральной нервной системе личинок 3-го возраста и мозга взрослых мух, содержащихся при 25 °С и 29 °С на основании данных флуоресцентной гибридизации *in situ***

С помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* мы показали, что *Wolbachia* штамма wMelPop неравномерно распределены как в ЦНС личинки 3-го возраста, так и в мозге взрослой мухи. В ЦНС личинки 3-го возраста высокая плотность бактерий выявлялась в центральных областях мозга и БНС, а также в подглоточном ганглии. Обобщённые данные локализации бактерий в ЦНС личинок представлены на рисунке 44. Специфическое распределение *Wolbachia* коррелирует с расположением нейробластов в ЦНС личинки. Важно также отметить, что повышенная температура не оказывала существенного влияния на локализацию и титр бактерий в клетках на личиночной стадии развития как на 5-ый (Рис. 44 а, б), так и на 7-ой (Рис. 44 в, г) день развития. В мозге взрослых мух картина распределения бактерий сохранялась по сравнению с таковой в ЦНС личинки (Рис. 45). *Wolbachia* также обнаруживались в основном в центральных областях мозга (верхний протоцеребрум, антеннальные доли, подглоточный ганглий), меньше бактерий было выявлено в оптических долях, ламине и сетчатке.

Впервые продемонстрировано существенное влияние повышенной температуры на плотность бактерий в клетках мозга взрослых мух значительно проявляющееся уже на 1-ый день после вылета имаго (Рис. 45 а, б). Плотность бактерий в центральном мозге взрослых мух, содержащихся при 25 °С, была ниже, чем при 29 °С. Разница в плотности бактерий между этими группами продолжала расти с увеличением возраста мух, и к 13-ому дню была очень сильно заметна (Рис. 45 ж, з). Повышенная температура приводила к быстрой пролиферации бактерий во всех областях мозга *D. melanogaster*. Огромные скопления *Wolbachia* помимо центральных областей мозга выявлялись даже в ламине. Для того, чтобы оценить более точно динамику плотности бактерий в ЦНС личинок, а также различных отделов мозга взрослых мух, нами был проведён анализ титра *Wolbachia* в этих тканях с помощью программы ImageJ (Рис. 46). Плотность бактерий выражалась в виде отношения площади, занимаемой бактериями на конфокальном срезе мозга, к площади всего мозга на этом же конфокальном срезе. Были исследованы 3 образца мозга личинок 3-го возраста или взрослых мух по несколько конфокальных срезов с каждого мозга. Итоговое количество проанализированных срезов отражено в виде подписи точек на графике (Рис. 46). Для личинок 3-го возраста анализировались центральный мозг, подглоточный ганглий и зачатки оптических долей. Для взрослых мух исследовались подглоточный и надглоточный ганглии, а также ламина и сетчатка. При 25 °С начиная со стадии личинки 3-го возраста и заканчивая 13-ым днём после вылета имаго относительная плотность *Wolbachia* слегка увеличивается с  $1.76 \pm 0.13$  до  $4.5 \pm 0.19$  (Рис. 46). Повышенная температура оказывает более существенное влияние на относительную плотность бактерий, стремительно увеличивая её с  $1.7 \pm 0.11$  на стадии личинки (5-ый день развития) до  $16.2 \pm 1.79$  на

13-ый день после вылета имаго. Необходимо отметить, что различия в относительной плотности бактерий в мозге мух, содержащихся при разных температурах, были статистически значимыми только после вылета имаго (Тест Стьюдента, 1-ый день:  $t = 4.3$ ,  $P = 0.0003$ ; 3-ий день:  $t = 3.5$ ,  $P = 0.004$ ; 7-ой день:  $t = 3.1$ ,  $P = 0.008$ ; 13-ый день:  $t = 4.2$ ,  $P = 0.0006$ ). Резкое увеличение титра бактерий при 29 °C отмечалось между 7-ым и 13-ым днём.

#### **3.4.5. Сравнительный анализ плотности *Wolbachia* в клетках мозга куколок *D. melanogaster*, содержащихся при 25 °C и 29 °C на основании данных флуоресцентной гибридизации *in situ***

Для выяснения влияния температуры на динамику плотности бактерий в клетках формирующегося мозга при метаморфозе *D. melanogaster*, мы проанализировали с помощью программы ImageJ титр *Wolbachia* в нервной ткани на различных стадиях куколки. В исследование были взяты следующие стадии: «предкуколка» (личинка на 7-ой день развития, закрепляющаяся на стенке пробирки и начинающая формировать пупарий), «средняя» куколка (жёлто-коричневый пупарий, 35-45 часов после окукливания при 25 °C, стадии P6 и P7 согласно Bainbridge, Bownes, 1981) и «поздняя» куколка (коричневый пупарий, видны тёмные полосы крыльев на груди, 75-85 часов после окукливания при 25 °C, стадии P12 и P13). Данные, полученные с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ*, показали, что на всех вышеперечисленных стадиях куколки как при 25 °C, так и при 29 °C *Wolbachia* локализуются в основном в центральных областях мозга (Рис. 47 а-г, приведены последние две стадии куколки), что аналогично картине, описанной выше у личинок 3-го возраста (Рис. 44) и взрослых *D. melanogaster* (Рис. 45). По полученным изображениям сигнала бактерий в мозге мух на стадии метаморфоза

было выдвинуто предположение, что лишь на стадии «поздней» куколки при 29 °С происходит заметное увеличение плотности бактерий (Рис. 47 г). Анализ титра *Wolbachia* с помощью программы ImageJ показал, что если при 25 °С начиная с «предкуколки» и заканчивая «поздней» куколкой относительная плотность бактерий незначительно возрастала с  $2.45 \pm 0.84$  до  $3.33 \pm 0.3$  (Рис. 48), то при 29 °С она существенно увеличивалась с  $2.84 \pm 0.56$  до  $5.78 \pm 1.17$ . Титр *Wolbachia* достоверно увеличивался лишь на стадии поздней куколки (Тест Стьюдента, «поздняя» куколка:  $t = 3.33$ ,  $P = 0.006$ ), что коррелировало с качественным анализом изображений и подтверждало выдвинутую гипотезу.



## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Механизмы взаимоотношения организмов в эндосимбиотической ассоциации относятся к актуальным вопросам современной биологии, однако до сих пор это направление во многом не исследовано. Одним из подходов решения данной проблемы является анализ особенностей взаимодействия партнёров при воздействии на ассоциацию симбионт-хозяин стрессовыми факторами. В нашем исследовании в качестве стрессового фактора были выбраны повышенные и пониженные температурные воздействия на линию *D. melanogaster* w1118, заражённую патогенным штаммом *Wolbachia* wMelPop.

### **4.1. Особенности взаимоотношений внутри ассоциации *Wolbachia-D. melanogaster* в условиях повышенной и пониженной температуры**

Влияние стрессовых температур на любую симбиотическую ассоциацию следует рассматривать отдельно со стороны каждого из партнёров, а также на ассоциацию в целом. Такой подход позволяет получить полную картину особенностей взаимоотношения симбионтов.

#### **4.1.1. Влияние повышенной и пониженной температуры на организм *D. melanogaster***

Жизнеспособность эктотермных животных сильно зависит от температурных условий (Precht *et al.*, 1973; Cossins, Bowler, 1987). В окружающей среде организмы испытывают ежедневные флуктуации температур, часто с амплитудой более чем 10 °C. В природе, попав в стрессовые условия, животное обычно стремится покинуть

их как можно быстрее, поэтому воздействие определённой температуры происходит лишь кратковременно. Оптимальная температура развития *D. melanogaster* составляет 22 °С (Petavy *et al.*, 2001). При её повышении сроки развития мух сокращаются и достигают минимума (8-9 дней) при 29 °С. Было показано, что жизнеспособность *D. melanogaster* стабильна в диапазоне от 14 до 26 °С и падает до нуля при снижении температуры до 10 °С или увеличении до 33 °С (Petavy *et al.*, 2001). Согласно нашим результатам и данным, полученным ранее коллегами, постоянное содержание не инфицированных *Wolbachia D. melanogaster w1118T* при 29 °С вызывает снижение их ПЖ в 2 раза по сравнению с ПЖ при 25°С (Min, Benzer, 1997; Strunov *et al.*, 2013). В то же время, при пониженной температуре 16 °С мухи этой же линии живут примерно в 2,5 раза дольше по сравнению с ПЖ при 25 °С (Вайсман и др., 2009; Струнов и др., 2013). Исследования влияния температуры на ПЖ эктотермных животных проводятся уже много лет (Loeb, Northrop, 1917; Miquel *et al.*, 1976; Buchan, Sohal, 1981; Farmer, Sohal, 1987). Результаты этих исследований демонстрируют прямую связь температуры, активности животного и его ПЖ. Было показано, что ПЖ *D. melanogaster* при низкой температуре (18 °С) окружающей среды увеличивается за счёт снижения активности мух, а при повышенной (28 °С) с возрастанием их активности ПЖ, наоборот, уменьшается (Miquel *et al.*, 1976). Было также продемонстрировано прямое влияние температуры на скорость метаболизма (Berrigan, Partridge, 1997). Интересно, что при искусственном повышении активности медовых пчёл *Apis mellifera* путём привязывания к их телу дополнительного веса было продемонстрировано снижение их ПЖ по сравнению с пчёлами, живущими без груза (Wolf, Schmid-Hempel, 1989). В данной ситуации лишний вес стимулировал повышение метаболизма насекомых, поскольку

активность животного напрямую связана с обменом веществ (Speakman, 2005). Таким образом, в нашей работе температура 29 °С является стрессовой, но не критической температурой для *D. melanogaster*, она положительно влияет на активность мух и соответственно на их метаболизм, снижая в итоге ПЖ насекомых. Пониженная температура (16 °С) входит в диапазон стабильной температуры для жизнеспособности мух, приводит к замедлению их активности и метаболизма, увеличивая в результате ПЖ. Интересно, что по нашим данным и результатам, полученным в лаборатории генетики популяций ИЦиГ СО РАН, перенос на 16 °С может частично или полностью восстанавливать ПЖ не инфицированных бактериями *D. melanogaster w1118T*, которые до этого содержались при 29 °С (Струнов и др., 2013; Илинский, неопубл.). Полное восстановление ПЖ мух происходит при их содержании в условиях повышенной температуры в течении первых трех дней после вылета имаго включительно. При воздействии температурой 29 °С дольше указанного периода, происходит постепенное снижение выживаемости при 16 °С. Таким образом, нами впервые был выделен минимальный период воздействия повышенной температуры (более 3-х дней), который вызывает существенные изменения ПЖ и выживаемости *D. melanogaster* (Струнов и др., 2013).

Следует отметить, что при пониженной температуре ПЖ самцов оказалась ниже, чем у самок, хотя при 25 °С и при 29 °С различия не были статистически значимыми. Согласно литературным данным, у многих видов животных ПЖ мужского пола меньше, чем у женских особей (Smith, 1989). Такая же картина наблюдается и у *D. melanogaster*. Недавние исследования показали, что механизм, определяющий различия в продолжительности жизни полов, связан с особенностью репродуктивной системы насекомых (Шапошников, Москалёв, 2007). Например,

удаление клеток зародышевого пути с помощью мутации *tudor* приводило к увеличению на 20% средней ПЖ самцов, однако никак не влияло на среднюю ПЖ самок (Shen *et al.*, 2009). Существует предположение, что семенники у самцов индуцируют неизвестный фактор, сокращающий продолжительность их жизни (Шапошников, Москалёв, 2007). По-видимому, различия между средней ПЖ самок и самцов в нашем исследовании не успевают проявиться при умеренной (25 °С) и повышенной температурах (29 °С), и выявляются только при увеличении ПЖ при 16 °С.

Согласно последним литературным данным, ответ на воздействие стрессовой температуры у беспозвоночных животных (например, *C. elegans*) регулируется на уровне их нервной системы. В процессах регуляции задействованы термочувствительные нейроны, удаление которых приводит к сокращению ПЖ нематод, содержащихся при повышенной температуре (Lee, Kenyon, 2009). При тепловом стрессе происходит активация термочувствительных нейронов, которые передают сигналы, стимулирующие экспрессию стероидных гормонов геном *daf-9* (кодирует фермент цитохром P450, который необходим для синтеза стероидных гормонов). Эти химические агенты являются лигандами для ядерного рецептора гормонов DAF-12, задействованного в процессах развития и определения ПЖ взрослой особи (Antebi *et.al.*, 1998). Таким образом, в регуляции температурного стресса участвует DAF-9/DAF-12 стероидный сигнальный путь, нарушение которого приводит к уменьшению ПЖ организма при повышенной температуре (Lee, Kenyon, 2009). Интересно, что при воздействии пониженной температуры термочувствительные нейроны в процессах формирования ответа не участвуют, и регуляция осуществляется, очевидно, по другому пути (Lee, Kenyon, 2009).

Ответные реакции насекомых на повышенную и пониженную температуры согласно ранее полученным данным являются схожими (Chen *et al.*, 1991; Sinclair, Chown, 2003). Стрессовые белки (Hsp) выделяются как в одном, так и в другом случае, однако выявлены и небольшие отличия. Так, например, при действии повышенной температуры белки теплового шока выделяются немедленно в ответ на стресс, и клетка переходит на активную экспрессию этих белков, сводя до минимума продукцию белков «домашнего хозяйства» (Yocum, Denlinger, 1992). В то же время при пониженной температуре продукция стрессовых белков может идти в течение нескольких дней, причём параллельно с этим процессом в организме продолжается синтез и белков «домашнего хозяйства».

#### **4.1.2. Влияние повышенной и пониженной температуры на жизнеспособность *Wolbachia***

В природе бактерии постоянно сталкиваются с падением или возрастанием температуры окружающей среды (Storz *et al.*, 2000). Адекватный ответ на стрессовую температуру является необходимым условием для выживания одноклеточного организма в постоянно меняющихся условиях. Показано, что ответ на холодовой или тепловой шок основывается на определённых генетических программах, включающих несколько последовательных этапов (Schumann, 2012):

1. Регистрация стрессовой температуры молекулой-сенсором;
2. Индукция молекулой-сенсором напрямую или опосредованно работы группы «стрессовых» генов, специфичных стрессовому фактору;
3. Сокращение экспрессии «стрессовых» генов после адаптации к стрессовым условиям посредством обратной связи.

Изначальная регистрация стрессовой температуры обуславливается изменением конформации различных биомолекул, таких как ДНК, РНК и белки (Schumann, 2012). Среди перечисленных соединений молекулы РНК, или так называемые РНК термометры, быстрее всех реагируют на изменения температуры, контролируя процесс трансляции уже существующих или возникающих мРНК в организме (Kortmann, Narberhaus, 2012). Такой механизм ответа на стресс, напрямую затрагивающий синтетический аппарат бактерии, является своевременным и очень экономичным по энергетическим затратам. Реакция эндосимбиотических бактерий *Wolbachia* на стрессовую температуру, по-видимому, происходит аналогично описанной выше схеме. В нашем исследовании *Wolbachia* штамма wMelPop развивались как при 29 °С, так и при 16 °С. Эти эндосимбионты относятся к мезофильным бактериям, для которых оптимальной температурой для размножения считается 37 °С, хотя деление/размножение бактерий может идти в широком температурном диапазоне - от 22 °С до 42 °С (Кашнер, 1981; Zenova *et al.*, 2012). Показано, что повышенная температура (30-33 °С) элиминирует *Wolbachia* из организма двухточечного паутиного клеща *Tetranychus urticae* (van Opijnen, Breeuwer, 1999) и значительно сокращает титр бактерий у moskitov *Aedes albopictus* (Wiwatanaratnabutr, Kittayapong, 2009). Однако согласно результатам нашего исследования и данным, полученным ранее, длительное содержание *D. melanogaster* при повышенной температуре (29 °С) приводит к активации размножения и постепенному увеличению скопления бактерий в ткани мозга насекомого, а не к их элиминации (Min, Benzer, 1997). Отмечено, что патогенный эффект *Wolbachia* штамма wMelPop при повышении температуры увеличивался. Недавно было продемонстрировано, что при повышении температуры с 25 °С до 37 °С происходит

увеличение количества РНК на единичную клетку у бактерий *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia pestis*, что, как предполагается, играет важную роль в патогенезе бактерий (Shepherd *et al.*, 2013). Стоит заметить, что после 13 дней воздействия повышенной температуры мы регистрировали появление больших скоплений электронно-плотных структур, напоминающих деградирующие бактерии. Можно представить, что температура стимулировала метаболизм и размножение бактерий, в результате чего их количество в клетках увеличивалось, и параллельно, из-за недостатка питательных веществ, начиналась массовая деградация бактерий. В совокупности эти явления приводили к разрушению клеток и выходу бактерий из них. Было показано, что пониженные температуры (12 °C) способствуют элиминации бактерий *Wolbachia* у ос *Trichogramma* (Pintureau *et al.*, 2003). А у ос *Nasonia vitripennis* при 18 °C титр *Wolbachia* снижается на 65 % по сравнению с плотностью бактерий при 25 °C (Bordenstein, Bordenstein, 2011). Согласно нашим данным, постоянное содержание инфицированных wMelPop *D. melanogaster* при 16 °C не приводит к элиминации бактерий из организма хозяина. Несмотря на значительное увеличение средней ПЖ инфицированных мух при пониженной температуре по сравнению со средней ПЖ при 25 °C, негативное влияние *Wolbachia* на выживаемость мух при 16 °C сохраняется. Этот результат противоречит данным, полученным ранее другой группой (Вайсман и др., 2009; Вайсман и др., 2013), где аналогичная инфицированная линия *D. melanogaster* жила при 16 °C дольше неинфицированной. При пониженной температуре мы не обнаружили каких-либо существенных нарушений морфологии бактерии. Стоит отметить, что метаболизм бактерий продолжается даже при экстремально низких для них температурах (Sengupta, Chattopadhyay, 2013). Таким образом, в нашей

работе ни 29 °C, ни 16 °C не являются стрессовыми температурами для *Wolbachia* и, по-видимому, влияют лишь на скорость метаболизма бактерий.

Существование связи между температурой окружающей среды и экспрессией генов вирулентности бактерий было показано ранее (Lambris *et al.*, 2008). Так, например, повышение температуры до 37 °C является сигналом для патогенных микроорганизмов, стимулирующим активность их проникновения и размножения в организме теплокровных животных (Konkel, Tilly, 2000). В настоящей работе мы выявили усиление влияния инфицированности *D. melanogaster* бактериями *Wolbachia* на их выживаемость при повышенной температуре. Это позволяет предположить, что проявление вирулентности штамма wMelPop происходит по аналогичному механизму, только при температуре 29 – 30 °C, поскольку *Wolbachia* инфицирует хладнокровных животных, артропод и нематод.

#### **4.1.3. Влияние повышенной и пониженной температуры на взаимодействие партнеров в симбиотической системе *Wolbachia-D. melanogaster***

Известно, что даже незначительные температурные изменения могут воздействовать на устойчивость хозяина к инфекционному агенту, а также влиять на вирулентность и размножение паразита (Thomas, Blanford, 2003). Например, в холодных условиях окружающей среды грибковый патоген *Entomophaga grylli* действует как смертельный фактор на популяцию кузнечиков *Zonocerus variegatus*. Однако в солнечные дни при увеличении температуры даже на 2 °C инфицированный хозяин восстанавливается от болезни и создаёт устойчивую группу особей (Charman, Page, 1979). Повышенная температура может нарушать взаимодействие симбионтов и приводить к элиминации инфекции у тли (Ohtaka *et al.*, 1991) и носаток (Sasaki *et al.*, 1996). Пониженная температура (18 °C) приводит к



существенному снижению плотности *Spiroplasma* у *Drosophila nebulosa* и *D. melanogaster*, а повышенная температура (28 °C) немного снижает, либо никак не влияет на титр бактерий у этих хозяев. Как при пониженной, так и при повышенной температуре происходит подавление вертикальной передачи симбионта (Anbutsu *et al.*, 2008). Интересно, что содержание ос *Nasonia vitripennis* при пониженной температуре (18 °C) вызывает снижение плотности бактерий в организме хозяина и при этом повышается уровень цитоплазматической несовместимости (ЦН) по сравнению с контролем при 25 °C. При воздействии на ту же ассоциацию повышенной температурой (30 °C) происходит более существенное снижение титра бактерий, но это никак не отражается на уровне ЦН (Bordenstein, Bordenstein, 2011). В нашей работе было исследовано взаимодействие патогенного штамма *Wolbachia* wMelPop и *D. melanogaster* и установлено, что повышенная температура не вызывает снижения плотности бактерий, а наоборот способствует её увеличению, стимулируя размножение эндосимбионтов. На 7-ой день воздействия 29 °C появляются крупные скопления бактерий *Wolbachia*. Такая реакция бактерий на повышенную температуру, возможно, обуславливает ярко выраженную патогенность штамма wMelPop. Кроме того, повышенная температура, вероятно, приводит к снижению устойчивости хозяина к инфекции, и на этом фоне ярче проявляется воздействие *Wolbachia* на организм хозяина. Пониженная температура, как и в приведённых выше работах, уменьшает влияние *Wolbachia*, замедляя метаболизм бактерий.

#### **4.2. Возможные пути деградации бактерий *Wolbachia* штамма wMelPop в клетках мозга *D. melanogaster*. Гибель бактерий как один из главных факторов, снижающих продолжительность жизни *D. melanogaster***

Нами было установлено, что как в нормальных условиях, так и при действии повышенной или пониженной температуры на мух в клетках мозга *D. melanogaster* присутствуют *Wolbachia* с нарушенной структурой и электронно-плотным матриксом. Наиболее интересными являются электронно-плотные палочковидные бактерии, подобные которым были также описаны ранее в статье американских учёных (Min, Benzer, 1997). По нашим данным содержание насекомых при 29 °C в течение 13 дней приводит к резкому увеличению таких бактериальных форм. В процессе их формирования матрикс бактерий уплотняется и увеличивается пространство между внешней мембраной и клеточной стенкой. В клетках мозга были обнаружены переходные формы с полярным уплотнением матрикса, а также распределением его плотных фрагментов по всей клетке. Следует отметить, что электронно-плотные палочковидные бактерии встречаются либо поодиночке среди бактерий обычной формы, либо в многочисленных скоплениях. Данные бактериальные формы можно отнести как к деградирующим, так и к живым бактериям, перешедшими на новую стадию жизненного цикла. Рассмотрим и сравним правомочность существования каждого из двух перечисленных вариантов.

Ранее было показано, что гибель или деградация бактерий может происходить по двум основным генетическим системам: токсин-антитоксин система и система *mazEF* (Engelberg-Kulka, 2006). Первая система работает в случае потери бактерией своей плазмиды или внехромосомного материала, в результате чего происходит быстрая деградация неустойчивого антитоксина, ведущая к активации токсина и

гибели клетки (Hayes, 2003). Вторая система активируется в случае стрессовых ситуаций, приводящих к остановке экспрессии гена *mazEF*, кодирующего белок MazE, который опосредует процесс деградации бактерий (Aizenman *et al.*, 1996). Можно предположить, что в нашей работе *Wolbachia* штамма wMelPop гибнут в результате активации второй системы апоптоза, поскольку активное размножение бактерий в клетках мозга приводит к образованию больших скоплений эндосимбионтов и нехватке питательных веществ, что является стрессовой ситуацией для *Wolbachia*. Связь между процессом гибели бактерий и формированием электронно-плотных включений была отмечена ранее несколькими группами учёных на разных объектах (Wright, Barr, 1980; Hayes, Burgdorfer, 1982; Zhukova *et al.*, 2008).

Ранее было описано появление электронно-плотных образований в цитоплазме клеток нематод *Dirofilaria immitis*, инфицированных *Wolbachia* (Kozek, 2005). По мнению автора, эти структуры представляют собой одну из стадий размножения эндосимбионтов. Электронно-плотные нерастворимые белковые скопления, лежащие в матриксе бактерий, появляются в результате гиперэкспрессии гетерологичных генов и называются тельцами включения (inclusion bodies) (de Groot *et al.*, 2008). Долгое время данные включения считались биологически пассивными, не принимающими в жизни бактериальной клетки никакого участия, но в 2005 году была, наконец, доказана их функциональность (Garcia-Fruitos *et al.*, 2005; Talafova *et al.*, 2013). Как правило, тельца включения образуются в матриксе бактерий вследствие нехватки питания, и могут выступать в роли запасенного источника энергии, необходимой для их дальнейшей жизнедеятельности. Выделяют несколько основных веществ, образующих электронно-плотные включения: цианофициновые

гранулы, которые выступают в качестве хранилища азота, углерода и энергии; полифосфатные гранулы или волютин, являющиеся хранилищем фосфатов или источником энергии, заменяющим АТФ; магнетосомы, участвующие в обеспечении магнетотаксиса у бактерий (ориентирование вдоль геомагнитных линий) (Shively *et al.*, 2006). Можно предположить, что и в нашем исследовании электронно-плотные структуры являются новой жизненной формой бактерий *Wolbachia*, образующейся из-за нехватки питательных веществ и формирующейся при попадании в стрессовые условия.

Известно, что для широкого спектра грамотрицательных бактерий характерно наличие токсических веществ, локализующихся на поверхности внешней мембраны их клеточной стенки (Alouf, Freer, 1999). Экзотоксины выделяются бактериальной клеткой в процессе её жизнедеятельности, а эндотоксины находятся внутри микроорганизма и выводятся наружу только при разрушении или гибели микроорганизма (Alouf, Freer 1999). Данные вещества наносят вред как про-, так и эукариотическим организмам (Kuehn, Kesty, 2005). В клетках мозга нами были обнаружены бактерии с пузырьковидными структурами, лежащими между внешней мембраной и клеточной стенкой эндосимбионта. Недавние исследования *E. coli* и *Salmonella enterica* показали, что при помещении их в стрессовые условия, включая повышенную температуру, происходит активация процесса отделения пузырьков с неизвестным содержимым (McBroom, Kuehn, 2007). Выделяют ли *Wolbachia* какие-либо токсины в цитоплазму клеток мозга *D. melanogaster* не известно. Показано, что они могут выделять неизвестные пока вещества по 4 типу секреции (Rances *et.al.*, 2008). Поскольку многие линии *D. melanogaster* прекрасно сосуществуют с *Wolbachia*, можно предположить, что эти эндосимбионты не выделяют токсины в

клетки хозяина. Однако штамм *wMelPop* является патогенным, и, возможно, именно он секретирует токсические вещества. В то же время, нельзя исключить, что именно продукты деградации бактерий, а не их токсины, являются причиной гибели клеток, поскольку из-за ограниченности пространства в ткани мозга, заключённой в оболочку, их вывод из ткани мозга затруднён. Необходимо также отметить, что исследуемый патогенный штамм *Wolbachia wMelPop* был выявлен не только в мозге, но и в мышцах, сетчатке и репродуктивных органах, в которых тоже происходит разрушение бактерий. Не исключено, что интенсивное накопление эндосимбионта во многих органах хозяина и их деградация приводит в совокупности к гибели насекомого.

При исследовании влияния различных режимов температуры на *D. melanogaster* нами были также выявлены бактерии с сильно разреженным матриксом и электронно-плотной клеточной стенкой, что может свидетельствовать о вероятном нарушении, как синтетической активности, так и деградации клеточных мембран. Кроме того, мы наблюдали в цитоплазме клеток мозга *Wolbachia* с разрушенной клеточной стенкой и нарушением целостности внешней мембраны оболочки, сопровождающееся увеличением размеров бактерий и гомогенизацией их цитоплазмы. Иногда регистрировались одиночные бактерии или группы эндосимбионтов, заключённые в лизосомоподобные структуры, которые, по всей видимости, далее переваривали бактерий. На основании результатов электронно-микроскопического анализа можно предложить несколько разных путей деградации бактерий *Wolbachia* в клетках мозга *D. melanogaster*, приводящих к гибели эндосимбионтов:

1. Уплотнение бактериального матрикса, увеличение пространства между внешней мембраной и клеточной стенкой, а также изменение формы бактерий из коккоидной в палочковидную;
2. Разрежение и разрыхление матрикса бактерий, уплотнение их клеточной стенки и увеличение объёма эндосимбионтов;
3. Разрушение оболочки бактерий, гомогенизация матрикса и распад содержимого *Wolbachia* в цитоплазме хозяйской клетки;
4. Слияние *Wolbachia* с лизосомоподобными структурами клеток хозяина и переваривание бактерий внутри этих структур.

#### **4.3. Влияние повышенной температуры на титр бактерий *Wolbachia* в клетках мозга *D. melanogaster* проявляется начиная со стадии «поздней» куколки**

Согласно нашим данным, повышенная температура сильно увеличивает пролиферацию *Wolbachia* штамма wMelPop в клетках мозга взрослых *D. melanogaster*, что согласуется с ранее полученными результатами (Min, Benzer, 1997). Однако подобное воздействие не оказывает существенного влияния на размножение бактерий во время развития мух на стадии личинки 3-го возраста. На этой стадии развития в ткани мозга проходит вторая фаза нейрогенеза, во время которой из нейробластов формируются недифференцированные вторичные нейроны. Следует отметить, что у личинки 3-го возраста процесс нейрогенеза в различных областях ЦНС проходит асинхронно и в течение разных промежутков времени (Truman, Vate, 1988). В результате этого процесса по всей ткани развивающегося мозга перед метаморфозом формируется большое количество недифференцированных «молчащих» нейронов. Таким образом, отсутствие влияния

29 °C на титр *Wolbachia* в клетках ЦНС личинок 3-го возраста может быть по причине большого количества пассивных нейронов и клеток глии, в которых не происходит активного синтеза питательных веществ, необходимых для интенсивного размножения штамма *wMelPop*.

Построенные на основании наших исследований график динамики относительной плотности бактерий *Wolbachia* в ЦНС личинки и ткани мозга взрослых мух показал, что активное размножение бактерий при 29 °C происходит во время метаморфоза *D. melanogaster*. Подробный анализ изменения титра бактерий в метаморфозе мух выявил, что увеличение плотности *Wolbachia* происходит именно на стадии «поздней» куколки. Это позволяет нам предположить, что данная стадия является специфической фазой, которая стимулирует пролиферацию *wMelPop* в ЦНС хозяина при 29 °C. Период метаморфоза *Drosophila* характеризуется высоким титром экидистероидов, которые запускают формирование пупария и сам процесс метаморфоза (Riddiford, 1993). ЦНС, гонады и Мальпигиевы сосуды являются единственными органами, которые сохраняются на этой стадии и продолжают развиваться во время метаморфоза. (Robertson, 1936; Shukla, Tapadia, 2011). Первый пик экидистероидов, сразу после окукливания, затрагивает «молчащие» клетки мозга личинки, которые активируются и между ними начинается процесс формирования новых связей (Truman, Reiss, 1995). Второй и самый большой пик гормонов на стадии куколки (между «средней» и «поздней») регистрируется позднее и связан с созреванием и синаптогенезом специфичных нейронов для взрослого мозга насекомого, которые были сохранены во время развития личинки (Truman, 1996). Показано, что повышенная температура может увеличивать экспрессию экидистероидов, ускоряя время прохождения стадии

куколки. Быстрая активация личиночных и специфичных взрослому мозгу нейронов при 29 °С с высоким титром экдистероидов приводит к наработке большого количества субстратов внутри клеток, необходимых для их развития. Избыточное количество питательных веществ внутри клеток мозга хозяина является великолепной средой и сигналом для размножения патогенного штамма. Стоит также отметить, что для деления и формирования новой внешней мембраны *Wolbachia* используют эндоплазматический ретикулум (ЭПР) клетки хозяина (Roy, 2002). Активация синтетической активности аппарата Гольджи и ЭПР нейронов, формирующих многочисленные новые связи между собой, и клеток глии, которые поддерживают нейроны в процессе метаморфоза, является, вероятно, благоприятным периодом для быстрого размножения патогенного штамма *Wolbachia* wMelPop.

При наложении графиков динамики концентрации экдистероида на стадиях личинки, куколки и взрослой мухи и относительной плотности бактерий *Wolbachia* в ЦНС на аналогичных стадиях, заметна корреляция пика экдистероида на стадии «средней» и «поздней» куколки с увеличением титра бактерий (Рис. 49).

#### **4.4. Особенности распределения *Wolbachia* штамма wMelPop на разных стадиях жизненного цикла *D. melanogaster***

Наше исследование продемонстрировало неравномерное распределение *Wolbachia* штамма wMelPop в ЦНС личинки 3-го возраста. В области подглоточного ганглия, центральном мозге и центральной части брюшного нервного ствола (БНС) обнаруживается большое количество бактерий (10 – 200 бактерий на конфокальный срез клетки), когда как большинство клеток зачатков оптических долей и латеральных областей БНС свободны от *Wolbachia*. Неравномерное распределение



штамма *wMelPop*, вероятно, формируется ещё в раннем эмбриогенезе мух, как было ранее предположено для *D. melanogaster* (Albertson *et al.*, 2009) и *Brugia malayi* (Landmann *et al.*, 2010).

Процесс распределения *Wolbachia* в ЦНС на протяжении различных стадий жизненного цикла мух может быть разделен на два основных периода. В первом периоде происходит равномерное распределение бактерий между делящимися клетками в оогенезе и раннем эмбриогенезе до стадии гаструляции и отслоения нейробластов. Во втором периоде распределение *Wolbachia*, начиная с нейрогенеза и заканчивая формированием различных отделов мозга, осуществляется неравномерно. Было показано, что передача бактерий в будущее потомство заражённой мухи осуществляется во время раннего оогенеза путём равномерного распределения *Wolbachia* между клетками при формировании цистобласта из зародышевой стволовой клетки гермария. Цистобласт проходит серию симметричных делений, в результате чего формируется циста с равномерным распределением бактерий по всем клеткам (Рис. 50 а – г). Затем задняя зародышевая клетка становится ооцитом и содержит группу бактерий, локализованную в основном на заднем полюсе клетки (Рис. 50 д). Это немного неравномерное распределение сохраняется при созревании яйца (Рис. 50 е, ж) (Serbus *et al.*, 2008). Сформированное яйцо затем синхронно делится во время раннего эмбриогенеза, и бактерии в равных количествах расходятся к каждой дочерней центросоме, определяя, таким образом, равномерное распределение *Wolbachia* по всему эмбриону после стадии целлюляризации (Рис. 51) (Kose, Karr, 1995). Во время гаструляции эмбриона формируется три зародышевых листа, клетки которых, вероятно, одинаково инфицированы бактериями (Leptin, 1999). Сформированный

эктодермальный листок содержит брюшную и процефалическую нейрогенную область, из которой образуются, соответственно, нейробласты БНС и мозга эмбриона после серии симметричных делений (Urbach, Technau, 2004). Было показано, что *Wolbachia* равномерно распределяются между эпителиальными клетками и образующимися нейробластами, занимая в обеих клетках апикальное положение (Рис. 52) (Albertson *et al.*, 2009). Затем начинается второй период, характеризующийся неравномерным распределением бактерий по клеткам. После отслоения от эпителиального слоя, нейробласты ассиметрично делятся, образуя самообновляющуюся клетку и ганглиозную материнскую клетку (ГМК), из которой формируются, впоследствии, нейроны и клетки глии. Во время этого деления, бактерии перемещаются в формирующийся нейробласт, но не отходят в ГМК (Albertson *et al.*, 2009). Интересно, что эффективность разделения бактерий по формирующимся клеткам зависит от штамма *Wolbachia*. По сравнению со штаммами *w*Ri и *w*Me1, патогенный штамм *w*Me1Pop имеет наибольшую вероятность попасть в ГМК (Albertson *et al.*, 2009). Таким образом, ассиметричная передача бактерий *Wolbachia* во время нейрогенеза приводит к неравномерному распределению бактерий по всей ЦНС эмбриона (Рис. 53), и такая картина сохраняется на личиночных стадиях. Наши результаты согласуются с вышеописанными данными, демонстрируя, что в ЦНС личинки 3-го возраста при 25 °С *w*Me1Pop предпочтительно инфицирует области в центре базальных сегментов БНС и мозга, и распределение инфекции соотносится с положением нейробластов (Рис. 54 а, б). Каждая из этих клеток содержит 10–200 бактерий на конфокальный срез (вторая группа клеток). Менее инфицированные области, расположенные по периферии и в апикальных слоях ЦНС, состоят из первичных и вторичных нейронов

и клеток глии, образованных из нейробластов и содержащих 1–10 бактерий *Wolbachia* на срез клетки (первая группа клеток). В результате ассиметричного деления нейробластов, по-видимому, лишь небольшая часть бактерий попадает в ГМК.

В отличие от остальных клеток ЦНС клетки зачатков оптических долей, не содержащие, в основном, бактерий, формируются другим путём во время нейрогенеза (Urbach *et al.*, 2003). Они отслаиваются от эктодермы как отдельная группа клеток и впоследствии прикрепляются к образующемуся мозгу, в то время как все нейробласты мозга уже сформировались (Green *et al.*, 1993). Вероятно, именно поэтому мы обнаружили лишь несколько клеток (предположительно нейробластов) в зачатках оптических долей, содержащих низкий титр *Wolbachia*.

Картина распределения *wMelPop* в мозге взрослых мух, содержащихся при 25 °С в целом сходна с картиной, описанной для ЦНС личинки. Наиболее инфицированными областями являются центральный мозг, включающий верхний протоцеребрум и антеннальные доли, а также подглоточный ганглий, в то время как большинство клеток оптических долей, ламины и сетчатки свободны от бактерий (Рис. 54 в). Эти области формируются, соответственно, из центрального мозга, подглоточного ганглия и зачатков оптических долей личинки и сохраняют личиночный паттерн распределения *Wolbachia*. Следует, однако, отметить, что плотность бактерий в клетках вышеперечисленных областей мозга взрослой мухи немного увеличивается. Во время метаморфоза личинки во взрослую муху, БНС отделяется от подглоточного ганглия и мозга личинки; при этом некоторые нейроны личинки умирают (Truman, 1990). Выжившие клетки начинают интенсивно образовывать аксоны и дендриты, контактируя между собой и расширяя

пространство мозга. Около 95 % нейронов мозга взрослой мухи имеют постэмбриональное происхождение (Urbach *et al.*, 2003). Интересно, что всего 100 нейробластов ЦНС личинки дают начало тысячам дифференцированных нейронов центрального мозга взрослой мухи (Urbach *et al.*, 2003). Для того чтобы образовать такое большое количество нейронов, дорсомедиальные линии нейробластов центрального мозга личинки делятся ассиметрично, производя самообновляющуюся клетку и промежуточную дочернюю клетку предшественницу (вместо ГМК), которая сохраняет потенциал к самообновлению и впоследствии увеличивает количество нейронов в три или пять раз. Эти клетки не содержат детерминант клеточной судьбы Prospero и поэтому сохраняют возможность самообновляться (Bello *et al.*, 2008). Интенсивный нейрогенез во время постэмбрионального периода и эффективный способ пролиферации нейробластов в центральном мозге личинок приводят, вероятно, к широкому распространению *Wolbachia* в мозге взрослой мухи. В центральном мозге взрослой мухи мы обнаруживали все три группы клеток, выделенных на основании плотности бактерий в цитоплазме, однако вторая и третья группа встречались чаще всего, особенно к 13-му дню содержания при повышенной температуре. Сдвиг от первой и второй группы клеток в ЦНС личинки 3-го возраста ко второй и третьей группам клеток мозга взрослой мухи происходит, вероятно, из-за активной пролиферации бактерий в нейронах и клетках глии. Наши данные по оценке процентного соотношения перечисленных групп клеток подтвердили существование этого сдвига. Оптическая доля, ламина и сетчатка содержат лишь несколько скоплений *Wolbachia*. По-видимому, задержка в созревании зачатков оптических долей и их специфический способ формирования во время эмбриогенеза обуславливают низкий титр бактерий и неравномерное распределение *wMelPop* в

оптических долях, ламине и сетчатке взрослой мухи. Высокая температура ускоряет пролиферацию бактерий в клетках каждой области мозга взрослой мухи. Таким образом, сдвиг от первой и второй групп клеток по плотности бактерий в ЦНС личинки ко второй и третьей группе клеток в мозге взрослой мухи при 29 °C очень заметен (Рис. 54 г).

Согласно результатам, полученным в настоящей работе, клетки центрального мозга и поглочного ганглия *D. melanogaster* имеют самый большой титр *Wolbachia*. В центральном мозге выделяют большое количество центров, которые очень важны для жизнедеятельности мух: антеннальные доли, которые необходимы для обоняния, грибовидные тела, способствующие обучению и памяти, и центральный комплекс, который контролирует полёт, визуальную память, ухаживание и пение (Hanesch *et al.*, 1989; Zars *et al.*, 2000). Присутствие бактерий в специфических областях мозга *Drosophila* позволяет предположить, что *Wolbachia* влияют на поведение хозяина (Albertson *et al.*, 2009). Однако, тонкое воздействие на определённые центры мозга хозяина возможно лишь в случае инфицированности мух непатогенными штаммами *Wolbachia*, такими как *w*Ri, *w*Mel и *w*MelCS. Присутствие патогенного штамма *w*MelPop в клетках мозга *D. melanogaster* может влиять на поведение хозяина лишь из-за большой плотности бактерий в клетках мозга взрослой мухи. Таким образом, активная пролиферация *Wolbachia*, приводящая к широкому распространению бактерий по всему мозгу и к последующему разрушению его клеток не выглядит как утончённый механизм управления поведением хозяина.

## Заключение

Изучение структурной организации эндосимбионтов и особенностей их взаимодействия с организмом хозяина, помещённого в стрессовые условия, является одним из подходов в исследовании взаимоотношений партнёров симбиотической ассоциации. Комплексный подход с использованием популяционных методов исследования в совокупности с просвечивающей электронной, а также конфокальной микроскопией позволил подробно исследовать действие различных температурных режимов на ПЖ и выживаемость хозяина, ультраструктуру бактерий и их распределение в клетках мозга *D. melanogaster*. Показано, что при повышенной температуре (29 °C) происходит уменьшение ПЖ инфицированных *D. melanogaster*, вероятно за счёт пролиферации бактерий, которые оказывают негативное воздействие на хозяина. Незаражённая линия мух при аналогичных условиях живёт дольше. Установлено, что при пониженной температуре ПЖ увеличивается, как у инфицированных, так и неинфицированных насекомых, что, возможно, связано с замедлением процессов жизнедеятельности мух при 16 °C. После 7-го дня содержания мух при 29 °C отмечено резкое падение выживаемости особей, при этом зарегистрировано присутствие больших скоплений гибнущих бактерий по периферии мозга. Впервые, на основании электронно-микроскопического анализа были выделены переходные формы деградирующих бактерий и рассмотрены пути их гибели. При 13-ти дневном воздействии повышенной температуры на инфицированных *D. melanogaster*, пролиферация бактерий достигает максимума, и вызываемые ими разрушения клеток мозга приводят к массовой гибели мух даже при их переносе на 16 °C.

В данной работе впервые выявлены особенности распределения патогенного штамма *Wolbachia* wMelPop в клетках мозга на разных стадиях жизненного цикла *D. melanogaster* и при воздействии различными температурами. Показано, что картина локализации бактерий сохраняется в мозге взрослых мух и вероятно закладывается в раннем эмбриогенезе. Интересно, что высокая температура не оказывала существенного влияния на пролиферацию wMelPop в ЦНС личинок, однако значительно увеличивала титр бактерий уже на первый день после вылета имаго, приводя к появлению больших скоплений *Wolbachia* по всему мозгу, что вызывало разрушение его тканей и преждевременную гибель хозяина.

## ВЫВОДЫ

1. Бактерии *Wolbachia* патогенного штамма wMelPop присутствуют в телах нейронов периферических отделов мозга взрослых *D. melanogaster* w1118, где могут образовывать крупные скопления, а также в небольших количествах встречаются в клетках глии, межклеточном пространстве и под оболочкой мозга.
2. Определён критический период (7-13 дней) действия повышенной температуры на мух, после которого происходит стремительное накопление бактерий в клетках мозга и появление деградирующих *Wolbachia*. Эти изменения оказывают существенное снижение средней продолжительности жизни (ПЖ) и выживаемости *D. melanogaster* даже при температуре 16 °С, в то время как менее длительная обработка повышенной температурой с последующим переносом на 16 °С восстанавливает ПЖ мух.

3. Впервые описаны последовательные стадии деградации, как одиночных бактерий *Wolbachia* штамма wMelPop, так и их групп в клетках мозга *D. melanogaster*. Предложена схема этого процесса, включающая различные пути гибели бактерий, продемонстрированные специфическими переходными формами *Wolbachia* в цитоплазме нервных клеток.

4. Впервые продемонстрировано распределение *Wolbachia* штамма wMelPop в ткани мозга *D. melanogaster* на разных стадиях жизненного цикла хозяина. Показано, что повышенная температура не оказывает существенного влияния на титр бактерий в центральной нервной системе личинки мух, однако, значительно увеличивает его, начиная со стадии поздней куколки.

5. Специфический характер локализации бактерий *Wolbachia* в разных отделах мозга сохраняется у взрослых мух по сравнению с личинками и, очевидно, закладывается в раннем эмбриогенезе путём неравномерного распределения эндосимбионта при формировании первичных нейронов ЦНС хозяина.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Бухарин О. В., Усвяцов, Б. Я. Бактерионосительство (медико-экологический аспект). – Екатеринбург: УрО РАН, 1996. – 207 с.
2. Вайсман, Н. Я., Илинский, Ю. Ю., Голубовский, М. Д. Популяционно-генетический анализ продолжительности жизни *Drosophila melanogaster*: сходные эффекты эндосимбионта *Wolbachia* и онкосупрессора *lgl* в условиях температурного стресса // Журнал общей биологии. – 2009. – Т. 70. - № 5. - С. 438 – 447.
3. Вайсман Н. Я., Голубовский М. Д., Илинский Ю. Ю. Различия в параметрах продолжительности жизни и ее пол-специфичности в популяциях человека и их моделирование на дрозофиле // Успехи геронтологии. – 2013. – Т. 26. № 1. – С. 66 – 75.
4. Воронин, Д. А., Бочерилов, А. М., Баричева, Э. М., Захаров, И. К., Киселёва, Е. В. Влияние генотипического окружения хозяина – *Drosophila melanogaster* – на биологические эффекты эндосимбионта *Wolbachia* (штамм wMelPop) // Цитология. – 2009. – Т. 51. - № 4. – С. 335 – 345.
5. Горячева И. И. Бактерии рода *Wolbachia* – репродуктивные паразиты членистоногих // Успехи современной биологии. – 2004. Т. 124. - № 3. - С. 246 – 259.
6. Дудкина, Н. В., Воронин, Д. А., Киселёва, Е. В. Структурная организация и распределение симбиотических бактерий *Wolbachia* в ранних эмбрионах и яичниках *Drosophila melanogaster* и *D. simulans* // Цитология. – 2004. – Т. 46. - № 3. – С. 208 – 220.

7. Кашнер, Д. Жизнь микробов в экстремальных условиях // Пер с англ., под ред. Л. В. Калакуцкого и Е. Н. Кондратьевой – М.: Мир, 1981. – 522 с.
8. Маргелис, Л. Роль симбиоза в эволюции клетки // Пер с англ., под ред. Б. М. Медникова – М.: Мир, 1983. – 352 с.
9. Медведев, Н. Н. Практическая генетика. – М., 1968. – 238 с.
10. Жимулёв И. Ф. Общая и молекулярная генетика: учеб. пособие / Под. ред. Е. С. Беляева, А. П. Акифьева – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2003. – 479 с.
11. Жукова, М. В., Воронин, Д. А., Киселёва, Е. В. Изменение ультраструктуры симбиотических бактерий *Wolbachia* в яичниках и ранних эмбрионах *Drosophila* под влиянием повышенной температуры // Цитология. – 2008. – Т. 50. - № 12. – С. 1049-1059.
12. Струнов А. А., Илинский Ю. Ю., Захаров И. К., Киселёва Е. В. Влияние повышенной температуры на выживаемость *Drosophila melanogaster*, инфицированных патогенным штаммом бактерий *Wolbachia* // Вавиловский журнал генетики и селекции. – Принято в печать.
13. Шапошников, М. В., Москалев, А. А. Влияние дисгенной стерильности на половой диморфизм по продолжительности жизни у *Drosophila melanogaster* // Успехи геронтологии. – 2007. – Т. 20. – № 1. – С. 40 – 46.
14. Albertson, R., Casper-Lindley, C., Cao, J., Tram, U., Sullivan, W. Symmetric and asymmetric mitotic segregation patterns influence *Wolbachia* distribution in host somatic tissue // Journal of Cell Science. – 2009. – V. 122. – P. 4570 – 4583.

15. Albertson, R., Tan, V., Leads, R. R., Reyes, M., Sullivan, W., Casper-Lindley, C. Mapping *Wolbachia* distributions in the adult *Drosophila* brain // Cellular Microbiology. – 2013. In press.
16. Antebi, A., Culotti, J. G., Hedgecock, E. M. *daf-12* regulates developmental age and the dauer alternative in *C. elegans* // Development. – 1998. – V. 125. – P. 1191 – 1205.
17. Agnati, L. F., Barlow, P. W., Baldelli, E., Baluska, F. Are maternal mitochondria the selfish entities that are masters of the cells of eukaryotic multicellular organisms? // Commun. Integr. Biol. – 2009. – V. 2. – P. 194 – 200.
18. Aizenman, E., Engelberg-Kulka, H., Glaser, G. An *Escherichia coli* chromosomal “addiction module” regulated by guanosine-3959-bispyrophosphate: A model for programmed bacterial cell death // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1996. – V. 93. – P. 6059 – 6063.
19. Alouf, J. E., Freer, J. H. Bacterial Protein Toxins: A Sourcebook. Academic Press, London, England. – 1999.
20. Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., Stahl, D. A. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations // Applied Environmental Microbiology. – 1990. – V. 56. – P. 1919 – 1925.
21. Anbutsu, H., Goto, S., Fukatsu, T. High and low temperatures differently affect infection density and vertical transmission of male-killing *Spiroplasma* symbionts in *Drosophila* hosts // Applied and environmental microbiology. – 2008. – P. 6053–6059.

22. Bainbridge, S. P., Bownes, M. Staging the metamorphosis of *Drosophila melanogaster* // J. Embryol. Exp. Morph. – 1981. – V. – 66. – P. 57–80.
23. Baldo, L., Hotopp, J. C. D. K., Jolley, K. A., Bordenstein, S.R., Biber, S.A., Choudhury, R. R., Hayashi, C., Maiden, M. C. J., Tettelin, H., Werren, J. H. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis* // Applied and Environmental Microbiology. – 2006. – V. 72. – P. 7098–7110.
24. Baldo, L., Werren, J. H. Revisiting *Wolbachia* supergroup typing based on *wsp*: spurious lineages and discordance with MLST // Current Microbiology. – 2007. – V. 55. – P. 81–87.
25. Bandi, C., McCall, J. W., Genchi, C., Corona, S., Venco, L., Sacchi, L. Effects of tetracycline on the filarial worms *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* and their bacterial endosymbionts *Wolbachia* // International Journal for Parasitology. – 1999. – V. 29. – P. 357-364.
26. Bello, B. C., Izergina, N., Caussin, E., Reichert, H. Amplification of neural stem cell proliferation by intermediate progenitor cells in *Drosophila* brain development // Neural Development. – 2008. – V. 3. – P. 5.
27. Berrigan, D., Partridge, L. Influence of temperature and activity on the metabolic rate of adult *Drosophila melanogaster* // Comp. Biochem. Physiol. A Physiol. – 1997. – V. 118. P. 1301 – 1307.
28. Bian, G., Joshi, D., Dong, Y. *et al.* *Wolbachia* invades *Anopheles stephensi* populations and induces refractoriness to Plasmodium infection // Science. – 2013. – V. 340. – P. 748 – 751.

29. Bordenstein, S. R., Bordenstein, S. R. Temperature affects the tripartite interactions between bacteriophage WO, *Wolbachia*, and cytoplasmic incompatibility // PLoS One. – 2011. – V. 6. – e29106.
30. Bourtzis, K., Pettigrew, M. M., O'Neill, S. L. *Wolbachia* neither induces nor suppresses transcripts encoding antimicrobial peptides // Insect. Mol. Biol. – 2000. – V. 9. – P. 635 – 639.
31. Braig, H., Zhou, W., Dobson, S., O'Neill, S. Cloning and Characterization of a Gene Encoding the Major Surface Protein of the Bacterial Endosymbiont *Wolbachia pipientis* // Journal of Bacteriology. – 1998. – V. 180. – No. 9. – P. 2373–2378.
32. Breeuwer, J. A. J. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in the spider mites *Tetranychus urticae* and *T. turkestanii* // Heredity. – 1997. – V. 79. – P. 41–47. Broderick *et al.*, 2004
33. Brummel, T., Ching, A., Seroude, L., Simon, A. F., Benzer, S. *Drosophila* lifespan enhancement by exogenous bacteria // PNAS. – 2004. V. 101. – No. 35 – P. 12974–12979.
34. Buchan, P. B., Sohal, R. S. Effect of temperature and different sex ratios on physical activity and life span in the adult housefly, *Musca domestica* // Exp. Gerontol. – 1981. – V. 16. – P. 223 – 228.
35. Callaini, G., Dallai, R., Riparbelli, M. G. *Wolbachia*-induced delay of paternal chromatin condensation does not prevent maternal chromosomes from entering anaphase in incompatible crosses of *Drosophila simulans* // J. Cell Sci. – 1997. – V. 110. – P. 271–280.

36. Chapman, R. F. Page, W. W. Factors affecting the mortality of the grasshopper, *Zonocerus variegatus*, in Southern Nigeria // *J. Anim. Ecol.* – 1979. – V. 48. – P. 271 – 288.
37. Charlat, S., Bourtzis, K., Mercot, H. *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility // *Symbiosis: mechanisms and model systems* / Ed. Seckbach, J. – Dordrecht, Boston: Kluwer Academic publishers, 2001. – P. 621–644.
38. Charlat, S., Bonnavion, P., Mercot, H. *Wolbachia* segregation dynamics and levels of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila sechellia* // *Heredity.* – 2003. – V. 90. – P. 157–161.
39. Chen, C. P., Lee, R. E., Denlinger, D. L. Cold shock and heat shock: a comparison of the protection generated by brief pretreatment at less severe temperatures // *Physiol. Entomol.* – 1991. – V. – 16. – P. 19–26.
40. Clark, M. E., Anderson, C., Cande, J., Karr, T. L. Widespread prevalence of *Wolbachia* in laboratory stocks and the implications for *Drosophila* research // *Genetics.* – 2005. – V. 170 – P. 1667-1675.
41. Colombani, J., Raisin, S., Pantalacci, S. *et al.* A nutrient sensor mechanism controls *Drosophila* growth // *Cell.* – 2003. – V. 114. – P. 739 – 749.
42. Cossins, A. R., Bowler, K. *Temperature Biology of Animals.* Chapman & Hall, London – 1987.
43. Craig, E. A., Weissman, J. S., Horwich, A. L. Heat shock proteins and molecular chaperones: mediators of proteins conformation and turnover in the cell // *Cell.* – 1994. – V. 78. – P. 365-372.

44. Dale, C., Dunbar, H., Moran, N. A., Ochman, H. Extracting single genomes from heterogenous DNA samples: A test case with *Carsonella ruddii*, the bacterial symbiont of psyllids (Insecta) // *Journal of Insect Science*. – 2005. – V. 5. – No. 3.
45. Dean, M. D. A *Wolbachia*-associated fitness benefit depends on genetic background in *Drosophila simulans* // *Proc Biol Sci*. – 2006. – V. 273. – P. 1415-1420 Dedeine *et al.*, 2001
46. de Groot, N. S., Espargaro, A., Morell, M., Ventura, S. Studies on bacterial inclusion bodies // *Future Microbiol.* – 2008. – V. 3. – P. 423 – 435.
47. DeVeale, B., Brummel, T., Seroude, L. Immunity and aging: the enemy within? // *Aging Cell*. – 2004. – V. 3. – P. 195–208.
48. Dobson, S. L., Bourtzis, K., Braig, H. R. *et al.* *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues // *Insect. Biochem. Mol. Biol.* – 1999. – V. 2 – P. 153 – 160.
49. Dobson, S. L., Rattanadechakul, W. A novel technique for removing *Wolbachia* infections from *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) // *J Med Entomol.* – 2001. – V. 38. – P. 844–849.
50. Dumler, J. S., Barbet, A. F., Bekker, C. P. *et al.* Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2001. - V. 51. – P. 2145 – 2165.
51. Eleftherianos, I., Atri, J., Accetta, J., Castillo, J. C. Endosymbiotic bacteria in insects: guardians of the immune system? // *Front. Physiol.* – 2013. – V. 4. – 46.

52. Engelberg-Kulka, H., Amitai, S., Kolodkin-Gal, I., Hazan, R. Bacterial programmed cell death and multicellular behavior in bacteria // PLoS Genet. – 2006. – V. 2 – e135.
53. Faria, V. G., Sucena, E. *Wolbachia* in the malpighian tubules: evolutionary dead-end or adaptation? // J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol. – 2013. – V. 320. – P. 195 – 199.
54. Farmer, K. J., Sohal, R. S. Effects of ambient temperature on free radical generation, antioxidant defenses and life span in the adult housefly, *Musca domestica* // Exp. Gerontol. – 1987. – V. 22. – P. 59 – 65.
55. Feder, M. E., Krebs, R. A. Ecological and evolutionary physiology of heat shock proteins and the stress response in *Drosophila*: complementary insights from genetic engineering and natural variation // EXS. – 1997. – V. 83. – P. 155 – 173.
56. Fleury, F., Vavre, F., Ris, N., Fouillet, P., Bouletreau, M. Physiological cost induced by the maternally-transmitted endosymbiont *Wolbachia* in the *Drosophila* parasitoid *Leptopilina heterotoma* // Parasitology. – 2000. – V. 121 – P. 493-500.
57. Fox, R. Symbiogenesis // Journal of the royal society of medicine. – 2004. – V. 97. – No. 12. – P. 0141-0768.
58. Fry, A. J., Palmer, M. R., Rand, D. R. Variable fitness effects of *Wolbachia* infection in *Drosophila melanogaster* // Heredity. – 2004. – V. 93. – P. 379–389.
59. Frydman, H. M., Li, J. M., Robson, D. N., Wieschaus, E. Somatic stem cell niche tropism in *Wolbachia* // Nature. – 2006. – V. 441. – P. 509 – 512.
60. Garsin, D. A., Villanueva, J. M., Begun, J., Kim, D. H., Sifri, C. D., Calderwood, S. B., Ruvkun, G., Ausubel, F. M. Long-Lived *C. elegans daf-2* Mutants Are Resistant to Bacterial Pathogens // Science. – 2003. – V. 300. – P. 1921.



61. Gazla, I. N., Carracedo, M. C. Effect of intracellular *Wolbachia* on interspecific crosses between *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans* // Genet. Mol. Res. – 2009. – V. 8. – P. 861 – 869.
62. Gray, M. W., Doolittle, W. F. Has the endosymbiont hypothesis been proven? // Microbiol. Rev. – 1982. – V. 46. – P. 1-42.
63. Gabaldón, T., Huynen, M. A. From endosymbiont to host-controlled organelle: the hijacking of mitochondrial protein synthesis and metabolism // PLoS Comput. Biol. – 2007. – V. 3. – e219.
64. García-Fruitós, E., González-Montalbán, N., Morell, M. Aggregation as bacterial inclusion bodies does not imply inactivation of enzymes and fluorescent proteins // Microb. Cell. Fact. – 2005. – V. 4:27.
65. Ghelelovitch, S. Sur le determinisme genetique de la sterilite dans le croisement entre differenes souches de culex autogenicus roubaud. // C. R. Acad. Sci. Paris. – 1952. – V. 24. – P. 2386-2388. Laven, H. Crossing experiments with *Culex* strains // Evolution. – 1951. – V. 5. – P. 370-375.
66. Glover, D. M., Raff, J., Karr, T. L., O'Neil, S. L., Lin, H., Wolfner, M. F. Parasites in *Drosophila* embryos // Nature. – 1990. – V. 348. – P. 117.
67. Gong, W. J., Golic, K. J. Loss of Hsp70 in *Drosophila* Is Pleiotropic, With Effects on Thermotolerance, Recovery From Heat Shock and Neurodegeneration // Genetics. – 2006. – V. 172. – P. 275–286.
68. Gottlieb, Y., Zchori-Fein, E., Werren, J. H., Karr, T. L. Diploidy restoration in *Wolbachia*-infected *Muscidifurax uniraptor* (Hymenoptera: Pteromalidae) // J. Invertebr. Pathol. – 2002. – V. 81. – P. 166 – 174.

69. Green, P., Hartenstein, A. Y., Hartenstein, V. The embryonic development of the *Drosophila* visual system // *Cell Tissue Research*. – 1993. – V. 273. – P. 583 – 598.
70. Hanesch, U., Fischbach, K. F., Heisenberg, M. Neuronal architecture of the central complex in *Drosophila melanogaster* // *Cell Tissue Research*. – 1989. – V. 257. P. 343 – 366.
71. Haselkorn, T. S. The *Spiroplasma* heritable bacterial endosymbiont of *Drosophila* // *Fly*. – 2010. – V. 4. – P. 80–87.
72. Hayes, F. Toxins–antitoxins: Plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest // *Science*. – 2003. – V. 301. – P. 1496 – 1499.
73. Hayes, S. F., Burgdorfer, W. Reactivation of *Rickettsia rickettsii* in *Dermacentor andersoni* Ticks: an Ultrastructural Analysis // *Infection and immunity*. – 1982. – P. 779-785.
74. Heddi, A., Grenier, A. M., Khatchadourian, C., Charles, H., Nardon, P. Four intracellular genomes direct weevil biology: nuclear, mitochondrial, principal endosymbiont, and *Wolbachia* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 1999. – V. 96. – P. 6814 – 6819.
75. Hedges, L. M., Brownlie, J. C., O'Neill, S. L., Johnson, K. N. *Wolbachia* and virus protection in insects // *Science*. – 2008. – V. 322. – P. 702.
76. Heisenberg, M. Mushroom body memoir: from maps to models // *Nature reviews neuroscience*. – 2003. – V. 4. – P. 266-275.
77. Hertig, M., Wolbach, S. B. Studies of *Rickettsia*-like microorganisms in insects // *Journal of Medical Research*. – 1924. – V. 44. – P. 329-374.

78. Hertig, M. The rickettsia *Wolbachia pipientis* (gen. et. sp. n) and associated inclusions of the mosquito, *Culex pipiens* // *Parasitology*. – 1936. – V. 28. – P. 453 – 486.
79. Hilgenboecker, K., Hammerstein, P., Schlattmann, P., Telschow, A., Werren, J. H. How many species are infected with *Wolbachia*? - a statistical analysis of current data // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2008. – V. 281. – P. 215–220.
80. Hoffmann, A. A., Turelli, M., Simmons, G. M. Unidirectional incompatibility between populations of *Drosophila simulans* // *Evolution*. – 1986. – V. 40. – P. 692-701.
81. Hoffmann, A. A., Clancy, D., Duncan, J. Naturally-occurring *Wolbachia* infection in *Drosophila simulans* that does not cause cytoplasmic incompatibility // *Heredity*. – 1996. – V. 76. – P. 1-8.
82. Hoffmann, A. A., Montgomery, B. L., Popovici, J. *et al.* Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission // *Nature*. – 2011. – V. 476. – P. 454 – 457.
83. Howe, C. J., Barbrook, A. C., Nisbet, R. E. R., Lockhart, P. J., Larkum, A. W. D. The origin of plastids // *Phil. Trans. R. Soc. B*. – 2008. – V. 363. – P. 2675–2685
84. Hughes, G. L., Koga, R., Xue, P. *et al.* *Wolbachia* infections are virulent and inhibit the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae* // *PLoS Pathog.* – 2011. – V. 7. – e1002043.
85. Hurst, G. D. D., Majerus, M. E. N., Walker, L. E. Cytoplasmic male killing elements in *Adalia bipunctata* (Linnaeus) (Coleoptera: Coccinellidae) // *Heredity*. 1992. – V. 69. – P. 84-91.

86. Hurst, G. D. D., Jiggins, F. M., von der Schulenburg, J. H. G., Bertrand, D., West, S. A., Goriacheva, I. I., Zakharov, I. A., Werren, J. H., Stouthamer, R., Majerus, M. E. N. Male killing *Wolbachia* in two species of insect // Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. – 1999. – V. 266. – P. 735-740.
87. Iturbe-Ormaetxe, I., O'Neill, S. L. *Wolbachia*-host interactions: connecting phenotype to genotype // Current Opinion in Microbiology. – 2007. – V. 10. – P. 221–224.
88. Jiggins, F. M., Hurst, G. D. D., Majerus, M. E. N. Sex ratio distortion in *Acraea encedon* (Lepidoptera: Nymphalidae) is caused by a male-killing bacterium // Heredity. – 1998. – V. 81. – P. 87-91.
89. Kageyama, D., Nishimura, G., Hoshizaki, S., and Ishikawa, Y. Feminizing *Wolbachia* in an insect, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae) // Heredity. – 2002. – V. 88. – P. 444–449.
90. Kambris, Z., Cook, P. E., Phuc, H. K., Sinkins, S. P. Immune activation by life-shortening *Wolbachia* and reduced filarial competence in mosquitoes // Science. – 2009. – V. 326. – P. 134 – 136.
91. Konkel, M. E, Tilly, K. Temperature-regulated expression of bacterial virulence genes // Microbes Infect. – 2000. – V. 2. – P. 157 – 166.
92. Kortmann, J., Narberhaus, F. Bacterial RNA thermometers: molecular zippers and switches // Nat. Rev. Microbiol. – 2012. – V. 10. – P. 255 – 265.
93. Koukou, K., Pavlikaki, H., Kiliass, G., Werren, J. H., Bourtzis, K., Alahiotis, S. N. Influence of antibiotic treatment and *Wolbachia* curing on sexual isolation among *Drosophila melanogaster* cage populations // Evolution. – 2006. – V. 60. – P. 87 – 96.

94. Kozek, W. J. What is new in the *Wolbachia/Dirofilaria* interaction? // *Vet. Parasitol.* – 2005. – V. 133. – P. 127 – 132.
95. Kremer, N., Charif, D., Henri, H. Influence of *Wolbachia* on host gene expression in an obligatory symbiosis // *BMC Microbiol.* – 2012. – V. 12. – Suppl. 1:S7.
96. Kuehn, M. J., Kesty, N. C. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction // *Genes Dev.* – 2005. – V. 19. – P. 2645 – 2655.
97. Lassy, C. W., Karr, T. L. Cytological analysis of fertilization and early embryonic development in incompatible crosses of *Drosophila simulans* // *Mech. Dev.* – 1996. – V. 57. – P. 47 – 58.
98. Lambris, J. D., Ricklin, D., Geisbrecht, B. V. Complement evasion by human pathogens // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2008. – V. 6. – P. 132 – 142.
99. Landmann, F., Foster, J. M., Slatko, B., Sullivan, W. Asymmetric *Wolbachia* segregation during early *Brugia malayi* embryogenesis determines its distribution in adult host tissues // *PLoS Negl. Trop. Dis.* – 2010. – V. 4. – e758.
100. Lazareva, A. A., Roman, G., Mattox, W. *et al.* A role for the adult fat body in *Drosophila* male courtship behavior // *PLoS Genet.* – 2007. – V. 3. – e16.
101. Lee, S., Kenyon, C. Regulation of the Longevity Response to Temperature by Thermosensory Neurons in *Caenorhabditis elegans* // *Curr Biol.* – 2009. – V. 12. – No. 19. – P. – 715-722.
102. Legrand, J.J., Juchault P., Role de bacteries symbiotiques dans l'intersexualite, la monogenie et la speciation chez Crustaces Oniscoides // *Bull. Zool.* – 1986. – V. 53. – P. 161-172.
103. Leptin, M. Gastrulation in *Drosophila*: the logic and the cellular mechanisms // *EMBO J.* – 1999. – V. 18. – P. 3187 – 3192.

104. Lo, N., Paraskevopoulos, C., Bourtzis, K., O'Neill, S. L., Werren, J. H., Bordenstein, S. R. Bandi, C. Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis* // Int J Syst Evol Microbiol. – 2007. – V. 57. – P. 654-657.
105. Loeb, J., Northrop, J. H. What Determines the Duration of Life in Metazoa? // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 1917. – V. 3. – P. 382 – 386.
106. Lus, J. J. Some aspects of the population increase in *Adalia bipunctata*. 1. Heterozygosity of populations in lethal alleles // Dokl Akad Nauk SSSR. – 1947. – V. 57. – P. 825828.
107. Margulis, L., Sagan, D. The beast with five genomes // Natural History Magazine. – 2001.
108. Martin, W., Kovallik, K. V. Annotated English translation of Mereschkowsky's 1905 paper 'Ueber Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche' // Eur. J. Phycol. – 1999. – V. 34. – P. 287-295
109. Martinez, J., Duploux, A., Woolfit, M. Influence of the virus LbFV and of *Wolbachia* in a host-parasitoid interaction // PLoS One. – 2012. – V. 7. – e35081
110. McBroom, A. J., Kuehn, M. J. Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response // Mol. Microbiol. – 2007. – V. 63. – P. 545 – 558.
111. Meinertzhagen, I. A. Ultrastructure and quantification of synapses in the insect nervous system // Journal of Neuroscience. – 1996. – V. 69. – P. 59–73.
112. Meyer-Franke, A., Kaplan, M. R., Pfrieger, F. W., Barres, B. A. Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture // Neuron. – 1995. – V. 15. – P. 805 – 819.

113. Miller, W. J., Ehrman, L., Schneider, D. Infectious speciation revisited: impact of symbiont-depletion on female fitness and mating behavior of *Drosophila paulistorum* // PLoS Pathog. – 2010. – V. 6. – e1001214.
114. Min, K. T., Benzer, S. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1997. – V. 94. – P. 10792–10796.
115. Miquel, J., Lundgren, P. R., Bensch, K. G., Atlan, H. Effects of temperature on the life span, vitality and fine structure of *Drosophila melanogaster* // Mech. Ageing Dev. – 1976. – V. 5. – P. 347 – 370.
116. Montllor, C. B. Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress // Ecol. Entomol. – 2002. – V. 27. – P. 189–195.
117. Ohtaka, C., Ishikawa, H. Effects of heat treatment on the symbiotic system of an aphid mycetocyte // Symbiosis. – 1991. – V. 11. – P. 19 – 30.
118. O'Neill, S., Giordano, R., Colbert, A. M. E., Karrf, T. R., Robertson, H. M. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1992. – V. 89. – P. 2699-2702.
119. Opijnen, T. V., Breeuwer, J. A. J. High Temperatures Eliminate *Wolbachia*, a Cytoplasmic Incompatibility Inducing Endosymbiont, From the Two-spotted Spider Mite // Experimental and Applied Acarology. – 1999. – V. 23. – P. 871–881.
120. Pannebakker, B. A., Loppin, B., Elemans, C. P. H., Humblot, L., Vavre, F. Parasitic inhibition of cell death facilitates symbiosis // PNAS. – 2007. – V. 104. – No. 1. – P. 213–215.

121. Peng, Y., Nielsen, J. E., Cunningham, J. P., McGraw, E. A. *Wolbachia* infection alters olfactory cued locomotion in *Drosophila* spp. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2008. – V. 74. – P. 3943 – 3948.
122. Petavy, G., David, J. R., Gilbert, P., Moreteau, B. Viability and rate of development at different temperatures in *Drosophila*: a comparison of constant and alternating thermal regimes // *Journal of Thermal Biology.* – 2001. – V. 26. – P. 29-39.
123. Pintureau, B., Pizzol, J., Bolland, P. Effects of endosymbiotic *Wolbachia* on the diapause in *Trichogramma* hosts and effects of the diapause on *Wolbachia* // *Entomologia Experimentalis et Applicata.* – 2003. – V. 106. – P. 193–200.
124. Portaro, J. K., Barr, A. R. “Curing” *Wolbachia* infections in *Culex pipiens* // *Journal of Medical Entomology.* – 1975. – V. 12. – No. 2. – P. 265-265.
125. Precht, H., Christophersen, J., Hensel, H., Larcher, W. *Temperature and Life.* Springer, Berlin. – 1973.
126. Rajapaksha, R. M. C. P., Tobor-Kaplon, M. A., Baath, E. Metal Toxicity Affects Fungal and Bacterial Activities in Soil Differently // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2004. – P. 2966–2973
127. Rances, E., Voronin, D., Tran-Van, V., Mavingui, P. Genetic and Functional Characterization of the Type IV Secretion System in *Wolbachia* // *Journal of Bacteriology.* – 2008. – P. 5020–5030.
128. Reed, K., Werren, J. H. Induction of paternal genome loss by the paternal sex ratio chromosome and cytoplasmic incompatibility bacteria (*Wolbachia*): a comparison of early embryonic events // *Mol. Reprod. Dev.* – 1995. – V. 40. – P. 408-418.
129. Reichert, H., Boyan, G. Building a brain: developmental insights in insects // *Trends Neurosci.* – 1997. – V. 20. – P. 258 – 264.



130. Reynolds, K. T., Thomson, L. J., Hoffmann, A. A. The Effects of Host Age, Host Nuclear Background and Temperature on Phenotypic Effects of the Virulent *Wolbachia* Strain *popcorn* in *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. – 2003. – V. 164. – P. 1027–1034.
131. Richardson, P. M., Holmes, W. P., Saul, G. B. The effects of tetracycline on nonreciprocal incompatibility in *Mormoniella* [= *Nasonia*] *vitripennis* // *J. Invertebr. Pathol.* – 1987. – V. 50. – P. 176-183.
132. Riddiford, L. M. Hormone receptors and the regulation of insect metamorphosis // *Receptor*. – 1993. – V. 3. – P. 203 – 209.
133. Riegler, M., Sidhu, M., Miller, W. J., O’Neill, S. L. Evidence for a global *Wolbachia* replacement in *Drosophila melanogaster* // *Curr Biol*. – 2005. – V. 15. – P. 1428-1433.
134. Rigaud, T., Souty-Grosset, C., Raimond, R., Mocquard, J., Juchault, P. Feminizing endocytobiosis in the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare* Latr. (Isopoda): recent acquisitions // *Endocyto. Cell. Res.* – 1991. – V. 7. – P. 259-273.
135. Ritossa, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila* // *Experientia*. – 1962. – V. 18. – P. 571–573.
136. Roberts, D. B. *Drosophila*. A Practical Approach. – New York: Oxford University Press, 1998. – 389p.
137. Robertson, C. W. The metamorphosis of *Drosophila melanogaster*, including an accurately timed account of the principal morphological changes // *J. Morphol.* – 1936. – V. 59. – P. 351 – 399.
138. Ros, V. I. D., Fleming, V. M., Feil, E. J., Breeuwer, J. A. J. How Diverse Is the Genus *Wolbachia*? Multiple-Gene Sequencing Reveals a Putatively New *Wolbachia*

- Supergroup Recovered from Spider Mites (Acari: Tetranychidae) // Applied and environmental microbiology. – 2009. – P. 1036–1043.
139. Rowley, S. M., Raven, R. J., McGraw, E. A. *Wolbachia pipientis* in Australian spiders // Curr. Microbiol. – 2004. – V. 49. – P. 208–214.
140. Rousset, F., Bouchon, D., Pintureau, B. *et al.* *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods // Proc. Biol. Sci. – 1992. – V. 250. – P. 91 – 98.
141. Roy, C. R. Exploitation of the endoplasmic reticulum by bacterial pathogens // Trends Microbiol. – 2002. – V. 10. – P. 418 – 424.
142. Ryan, S. L., Saul, G. B., Conner, G. W. Aberrant segregation of R-locus genes in male progeny from incompatible crosses in *Mormoniella* // The Journal of Heredity. – 1985. – V. 76. – No. 1. – P. 21-26.
143. Saridaki, A., Bourtzis, K. *Wolbachia*: more than just a bug in insects genitals // Curr. Opin. Microbiol. – 2010. – V. 13. – P. 67 – 72.
144. Sasaki, T., Kawamura, M., Ishikawa, H. Nitrogen recycling in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*: involvement of yeast-like endosymbionts in uric acid metabolism // J. Insect. Physiol. – 1996. – V. 42. – P. 125 – 129.
145. Schumann, W. Thermosensor systems in eubacteria // Adv. Exp. Med. Biol. – 2012. – V. 739. – P. 1-16.
146. Scott, M. P., Pardue, M. L. Translational control in lysates of *Drosophila melanogaster* cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1981. – V. 78. – P. 3353–3357.
147. Sengupta, D., Chattopadhyay, M. K. Metabolism in bacteria at low temperature: A recent report // J. Biosci. – 2013. – V. 38. – P. 409 – 412.

148. Serbus, L. R., Casper-Lindley, C., Landmann, F., Sullivan, W. The genetics and cell biology of *Wolbachia*-host interactions // *Annu. Rev. Genet.* – 2008. – V. 42. – P. 683 – 707.
149. Shen, J., Ford, D., Landis, G. N., Tower, J. Identifying sexual differentiation genes that affect *Drosophila* life span // *BMC Geriatr.* – 2009. – V. 9:56.
150. Shepherd, D. P. Li, N., Micheva-Viteva, S. N. Counting Small RNA in Pathogenic Bacteria // *Anal. Chem.* – 2013. – V. 85. – P. 4938 – 4943.
151. Shively, J. M. (ed.). *Microbiology Monographs: Complex Intracellular Structures in Prokaryotes*, Springer, Berlin/Heidelberg. – 2006.
152. Sinclair, B. J., Chown, S. L. 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.* – 2003. – V. 49. – P. 45–52.
153. Smith, D.W. Is greater female longevity a general finding among animals? // *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* – 1989. – V. – 64. – No. 1. – P. 1-12.
154. Snook, R. R., Cleland, S. Y., Wolfner, M. F., Karr, T. L. Offsetting Effects of *Wolbachia* Infection and Heat Shock on Sperm Production in *Drosophila simulans*: Analyses of Fecundity, Fertility and Accessory Gland Proteins // *Genetics.* – 2000. – V. 155. – P. 167–178.
155. Solomon, J. M., Rossi, J. M., Golic, K., McGarry, T., Lindquist, S. Changes in Hsp70 alter thermotolerance and heat-shock regulation in *Drosophila* // *New Biol.* – 1991. – V. 3. – P. 1106–1120.
156. Speakman, J. R. Body size, energy metabolism and lifespan // *The Journal of Experimental Biology.* – 2005. – V. 208. – P. 1717 – 1730.

157. Swamynathan, S. K., Revathi, C. J., Srinivas, U. K. Identification and characterization of promoter elements responsible for the induction of the albumin gene by heat shock in early embryonic rat liver // *DNA Cell Biol.* – 1996. – V. 15. – P. 897 – 905.
158. Starr, D. J., Cline, T. W. A host-parasite interaction rescues *Drosophila* oogenesis defects. // *Nature.* – 2002. – V. 418. – P. 76–79.
159. Storz, G., Hengge-Aronis, R. *Bacterial Stress Responses.* Washington, DC. American Society for Microbiology. – 2000.
160. Stouthamer, R., Breeuwer, J. A., Hurst, G. D. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction // *Annu Rev Microbiol.* – 1999. – V. 53. – P. 71-102.
161. Strunov, A., Kiseleva, E., Gottlieb, Y. Spatial and temporal distribution of pathogenic *Wolbachia* strain *wMelPop* in *Drosophila melanogaster* central nervous system under different temperature conditions // *J. Invertebr. Path.* In press.
162. Sun, L. V., Foster, J. M., Tzertzinis, G., Ono, M., Bandi, C. Determination of *Wolbachia* genome size by pulsed-field gel electrophoresis // *J Bacteriol.* – 2001. – V. 183. – P. 2219–2225.
163. Suomalainen, E., Saura, A., Lokki, J. *Cytology and evolution in parthenogenesis* // CRC Press, Boca Raton, Fla. – 1987.
164. Talafoová, K., Hrabárová, E., Chorvát, D., Nahálka, J. Bacterial inclusion bodies as potential synthetic devices for pathogen recognition and a therapeutic substance release // *Microb. Cell Fact* – 2013. – V. 12:16

165. Shukla, A., Tapadia, M. G. Differential localization and processing of apoptotic proteins in Malpighian tubules of *Drosophila* during metamorphosis // *Eur. J. Cell Biol.* – 2011. – V. 90. – P. 72 – 80.
166. Taylor, M. J., Bandi, C., Hoerauf, A. M., Lazdins, J. *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes: A target foe control? // *Parasitol. Today.* – 2000. – V.16. – No. 5. – P. 179-180.
167. Telschow, A., Flor, M., Kobayashi, Y., Hammerstein, P., Werren, J. H. *Wolbachia*-Induced Unidirectional Cytoplasmic Incompatibility and Speciation: Mainland-Island Model // *PLoS One.* – 2007. - Issue 8. - e701.
168. Terasaki, M., Runft, L. L., Hand, A. R. Changes in organization of the endoplasmic reticulum during *Xenopus* oocyte maturation and activation // *Mol. Biol. Cell.* – 2001. – V. 12. – P. 1103 – 1116.
169. Thomas, M. B., Blanford, S. Thermal biology in insect-parasite interactions // *Trends Ecol. Evol.* – 2003. – V. 18. – No. – 7. – P. 344-350.
170. Thran, B. H., Hussein, S. H., Redelman, D., Fernandez, G. S. J. Influence of pH Treatments on Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Continuous Cultures of Rumen Contents // *Exp. Biol. Med.* – 2003. – V. 228. – P. 365-369
171. Townson, H. *Wolbachia* as a potential tool for suppressing filarial transmission // *Ann Trop Med Parasitol.* – 2002. – V. 96. – Suppl. 2. – P. 117-127.
172. Truman, J. W. Metamorphosis of the central nervous system of *Drosophila* // *J. Neurobiol.* – 1990. – V. 21. – P. 1072 – 1084.
173. Truman, J. W. Steroid receptors and nervous system metamorphosis in insects // *Dev. Neurosci.* – 1996. – V. 18. – P. 87 – 101.

174. Truman, J. W., Bate, M. Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the central nervous system of *Drosophila melanogaster* // *Dev. Biol.* – 1988. – V. 125. – P. 145 – 157.
175. Truman, J. W., Reiss, S. E. Neuromuscular metamorphosis in the moth *Manduca sexta*: hormonal regulation of synapses loss and remodeling // *J. Neurosci.* – 1995. – V. 15. – P. 4815 – 4826.
176. Urbach, R., Schnabel, R., Technau, G. M. The pattern of neuroblast formation, mitotic domains and proneural gene expression during early brain development in *Drosophila* // *Development.* – 2003. – V. 130. – P. 3589 – 3606.
177. Urbach, R., Technau, G. M. Neuroblast formation and patterning during early brain development in *Drosophila* // *Bioessays.* – 2004. – V. 26. – P. 739 – 751.
178. Vavre, F., DeJong, J. H., Stouthmer, R. Cytogenetic mechanism and genetic consequences of thelytoky in the wasp *Trichogramma cacoeciae* // *Heredity.* – 2004. – V. 93. – P. 592-596.
179. Veneti, Z., Clark, M. E., Karr, T. L., Savakis, C., Bourtzis, K. Heads or tails: host-parasite interactions in the *Drosophila-Wolbachia* system // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – V. 70. – P. 5366-5372.
180. Wernegreen, J. J. Endosymbiosis: Lessons in Conflict Resolution // *PLoS Biology.* – 2004. – V. 2. – Issue. 3. – P. 0307 – 0311.
181. Werren, J. H., Hurst, G. D. D., Zhang, W., Breeuwer, J. A. J., Stouthamer, R., Majerus, M. E. N. Rickettsial relative associated with male killing in the ladybird beetle (*Adalia bipunctata*) // *J. Bacteriol.* – 1994. – V. 176. – P.388-394.

182. Werren, J. H., Zhang, W., Guo, L.R. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*—reproductive parasites of arthropods // Proc. R. Soc. Lond. B. – 1995. – V. 261. – P. 55–63.
183. Werren, J. H. Biology of *Wolbachia* // Annu. Rev. Entomol. – 1997. – V. 42. – P. 587–609.
184. Werren, J. H., Baldo, L., Clark, M. E. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology // Nat. Rev. Microbiol. – 2008. – V. 6. – P. 741 – 751.
185. Wiwatanaratanabutr, I., Kittayapong, P. Effects of crowding and temperature on *Wolbachia* infection density among life cycle stages of *Aedes albopictus* // J. Invertebr. Pathol. – 2009. – V. 102. – P. 220 – 224.
186. Wolf, T. J., Schmid-Hempel, P. Extra loads and foraging lifespan in honeybee workers // J. Anim. Ecol. – 1989. – V. 58. – P. 943 – 954.
187. Wong, Z. S., Hedges, L. M., Brownlie, J. C., Johnson, K. N. *Wolbachia*-mediated antibacterial protection and immune gene regulation in *Drosophila* // PLoS One. – 2011. – V. 6. – e25430.
188. Wright, J. D., Barr, A. R. The ultrastructure and symbiotic relationships of *Wolbachia* of mosquitoes of the *Aedes scutellaris* group // J. Ultrastruct. Res. – 1980. – V. 72. – P. 52 – 64.
189. Yen, J. H., Barr, A. R. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* // Nature. – 1971. – V. 232. – P. 657-658.
190. Yocum, G. D., Denlinger, D. L. Prolonged thermotolerance in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, does not require continuous expression or persistence of the 72 kDa heat-shock protein // J. Insect Physiol. – 1992. – V. – 38. – P. 603–609.

191. Zars, T., Fischer, M., Schulz, R., Heisenberg, M. Localization of a short-term memory in *Drosophila* // *Science*. – 2000. – V. 288. – P. 672 – 675.
192. Zheng, Y., Wang, J. L., Liu, C. *et al.* Differentially expressed profiles in the larval testes of *Wolbachia* infected and uninfected *Drosophila* // *BMC Genomics*. – 2011. – V. 12:595.
193. Zenova, G. M., Kozhevin, P. A., Manucharova, N. A. *et al.* Temperature as a factor of development of psychrotolerant mycelial bacteria complexes in soils of north regions // *Izv. Akad. Nauk Ser. Biol.* – 2012. – V. 5. – P. 493 – 500.
194. Zhukova, M. V., Voronin, D. A., Kiseleva, E. V. High temperature initiates changes of *Wolbachia* ultrastructure in the ovaries and early embryos of *Drosophila melanogaster* // *Tsitologiya*. – 2008. – V. 50. – P. 1050 – 1060.
195. Zhukova, M. V., Kiseleva, E. The virulent *Wolbachia* strain wMelPop increases the frequency of apoptosis in the female germline cells of *Drosophila melanogaster* // *BMC Microbiol.* – 2012. – V. 12. Suppl. 1:S15.
196. Zug, R., Hammerstein, P. Still a host of hosts for *Wolbachia*: analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected // *PLoS One*. – 2012. – V. 7. – e38544.



## ПРИЛОЖЕНИЕ

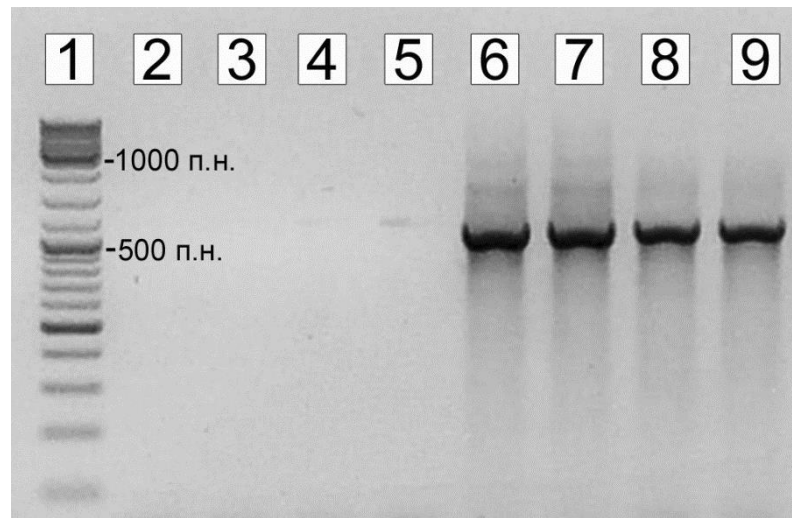


Рис. 7. Гель электрофорез, демонстрирующий наличие последовательности гена поверхностного белка *wsp* (1 – маркерная ДНК; 2 – 5 – неинфицированная линия; 6 – 9 – инфицированная линия).

```

1   TCCAATAAGTGATGAAGAAACTAGCTACTACGTTTCGTTTGCAATACAACGGTGAATTTTT 60
   |
84  TCCAATAAGTGATGAAGAAACTAGCTACTACGTTTCGTTTGCAATACAACGGTGAATTTTT 143
   |
61  ACCTCTTTTCACAAAAGTTGATGGTATTACCTATAAGAAAGACAAGAGTGATTACAGTCC 120
   |
144 ACCTCTTTTCACAAAAGTTGATGGTATTACCTATAAGAAAGACAAGAGTGATTACAGTCC 203
   |
121 ATTAAAACCATCTTTTATAGCTGGTGGTGGTGCATTTGGTTACAAAATGGACGACATCAG 180
   |
204 ATTAAAACCATCTTTTATAGCTGGTGGTGGTGCATTTGGTTACAAAATGGACGACATCAG 263
   |
181 GGTGATGTTGAAGGAGTTTATTCATACCTAAACAAAAATGATGTTAAAGATGTAACATT 240
   |
264 GGTGATGTTGAAGGAGTTTATTCATACCTAAACAAAAATGATGTTAAAGATGTAACATT 323
   |
241 TGACCCAGCAAATACTATTGCAGACAGTGTAACAGCAATTCAGGATTAGTGAACGTGTA 300
   |
324 TGACCCAGCAAATACTATTGCAGACAGTGTAACAGCAATTCAGGATTAGTGAACGTGTA 383
   |
301 TTACGATATAGCAATTGAAGATATGCCTATCACTCCATACATTGGTGTGGTGTGGTGC 360
   |
384 TTACGATATAGCAATTGAAGATATGCCTATCACTCCATACATTGGTGTGGTGTGGTGC 443
   |
361 AGCGTATATTAGCACTCCTTTGGAACCCGCTGTGAATGATCAAAAAAGTAAATTTGGTTT 420
   |
444 AGCGTATATTAGCACTCCTTTGGAACCCGCTGTGAATGATCAAAAAAGTAAATTTGGTTT 503
   |
421 TGCTGGTCAAGTAAAAGCTGGTGTTAGTTATGATGTAACCTCAGAAGTCAAACCTTATGC 480
   |
504 TGCTGGTCAAGTAAAAGCTGGTGTTAGTTATGATGTAACCTCAGAAGTCAAACCTTATGC 563
   |
481 TGGAGCTCGTTATTTTCGGTCTTATGGTGCTAATTTTGATGGAAAAAAAACAGATCCTAA 540
   |
564 TGGAGCTCGTTATTTTCGGTCTTATGGTGCTAATTTTGATGGAAAAAAAACAGATCCTAA 623
   |
541 AAATTC AACCGGACAGGCTGCTGATGCAGGCGCATACAAAGTTCTTTACAGCACTGTTGG 600
   |
624 AAATTC AACCGGACAGGCTGCTGATGCAGGCGCATACAAAGTTCTTTACAGCACTGTTGG 683
   |
601 TGCAGAAGCTGGAGTAGCGTTTAATTT 627
   |
684 TGCAGAAGCTGGAGTAGCGTTTAATTT 710

```

Рис. 8. Нуклеотидная последовательность бактериального гена *wsp*, полученная при ПЦР ДНК, выделенной из *D. melanogaster w1118*, имеет 100% гомологию с нуклеотидной последовательностью фрагмента гена *wsp Wolbachia* из базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Таблица 3. Средняя продолжительность жизни самок и самцов инфицированной *w1118* и неинфицированной *w1118T* бактериями *Wolbachia* линий *D. melanogaster* постоянно содержащихся при 25 °С, 29 °С и 16 °С.

Линия	Пол	25 °С	29 °С	16 °С
<i>w1118T</i>	♀	50,6 ± 2,0	26,8 ± 1,3	132,3 ± 2,6
	♂	52 ± 1,6	24,5 ± 1,1	112 ± 3,2
<i>w1118</i>	♀	32,6 ± 2,6	12,5 ± 0,9	103,8 ± 5,6
	♂	34,8 ± 2,5	13,2 ± 0,6	83,3 ± 5,7

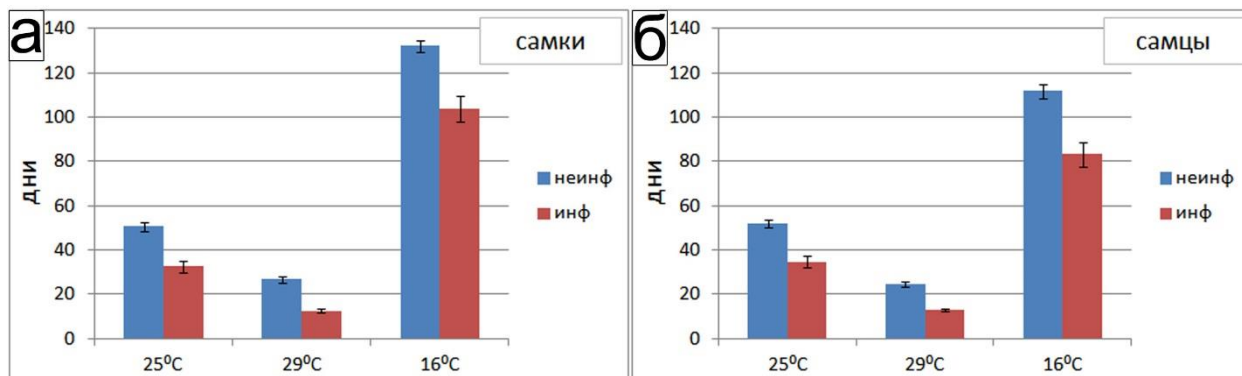


Рис. 9. Графики средней продолжительности жизни самок (а) и самцов (б) инфицированной *Wolbachia* и неинфицированной линий *D. melanogaster* (*w1118* и *w1118T*, соответственно) при постоянном содержании мух при 25 °С, 29 °С и 16 °С. Повышенная температура снижает среднюю ПЖ самок и самцов ~ в 2 раза, а пониженная температура увеличивает её в 2,5 раза.

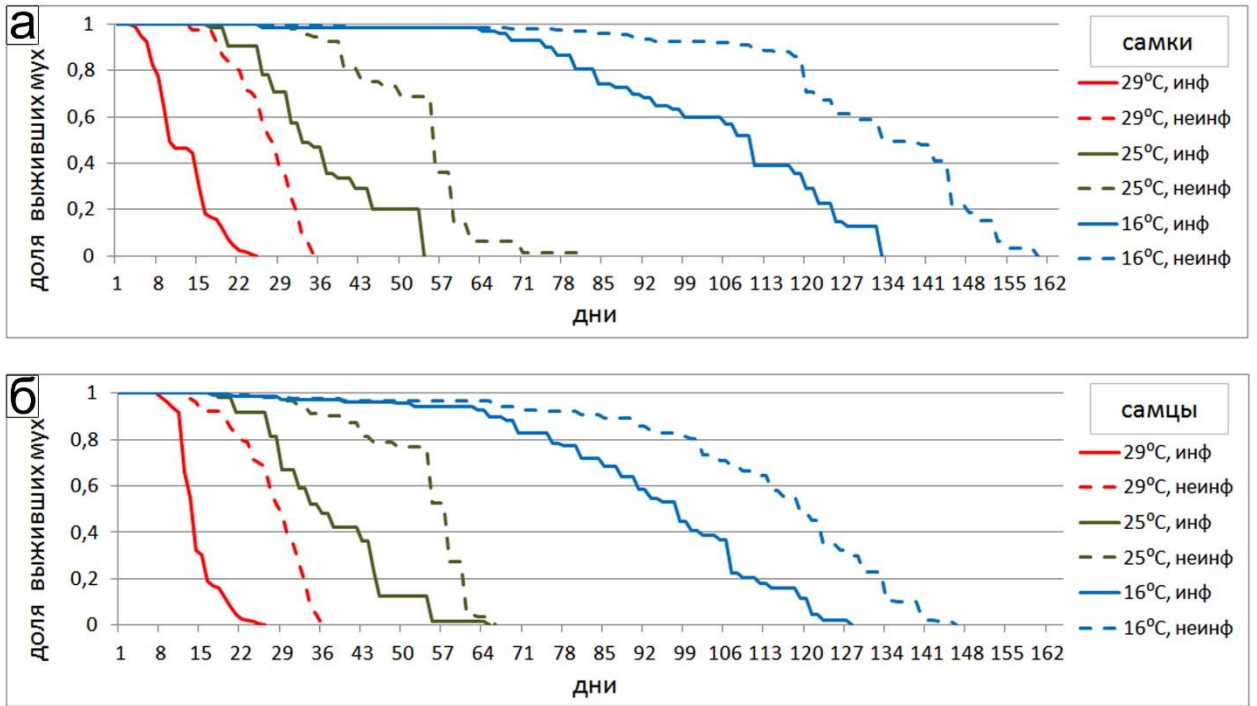


Рис. 10. Выживаемость самок (а) и самцов (б) не инфицированной и инфицированной *Wolbachia* линий мух, содержащихся постоянно при 25 °С, 29 °С и 16 °С. Снижение выживаемости как инфицированных, так и неинфицированных самцов более выражено по сравнению с самками.

Таблица 4. Значения средней продолжительности жизни (ПЖ) самок и самцов инфицированной *w1118* и неинфицированной *w1118T* бактериями *Wolbachia* линий *D. melanogaster* при 16 °С (контроль) и при 16 °С после предварительного содержания при 29 °С в течение 3, 7 и 13 дней.

	<i>w1118T</i>		<i>w1118</i>	
	♀	♂	♀	♂
дни содержания при 29 °С	средняя ПЖ	средняя ПЖ	средняя ПЖ	средняя ПЖ
0	132,3 ± 2,6	112 ± 3,2	103,8 ± 5,6	83,3 ± 5,7
3	114,9 ± 4,2	101 ± 4,9	96,7 ± 5,3	71,6 ± 3,3
7	123,8 ± 4,9	98,3 ± 3,7	72,1 ± 4,5	62,4 ± 3,9
13	77,0 ± 7,7	75,2 ± 5,6	28,1 ± 4,0	13,2 ± 1,1

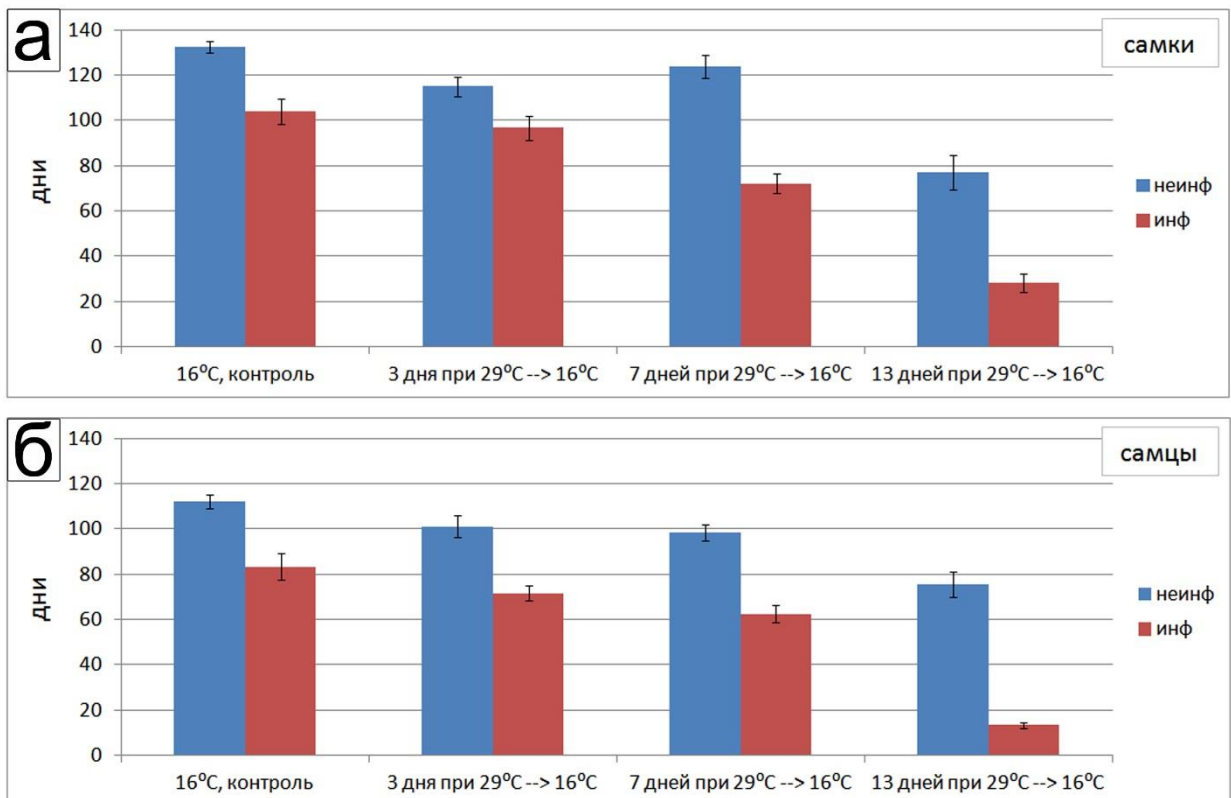


Рис. 11. Средняя продолжительность жизни самок (а) и самцов (б) инфицированной *Wolbachia* и неинфицированной линий *D. melanogaster* (*w1118* и *w1118T*, соответственно), содержащихся при 29 °С в течение 3, 7 и 13 дней и впоследствии перенесённых на 16 °С. В период с 7-го по 13-й день происходит заметное падение средней ПЖ инфицированных мух.

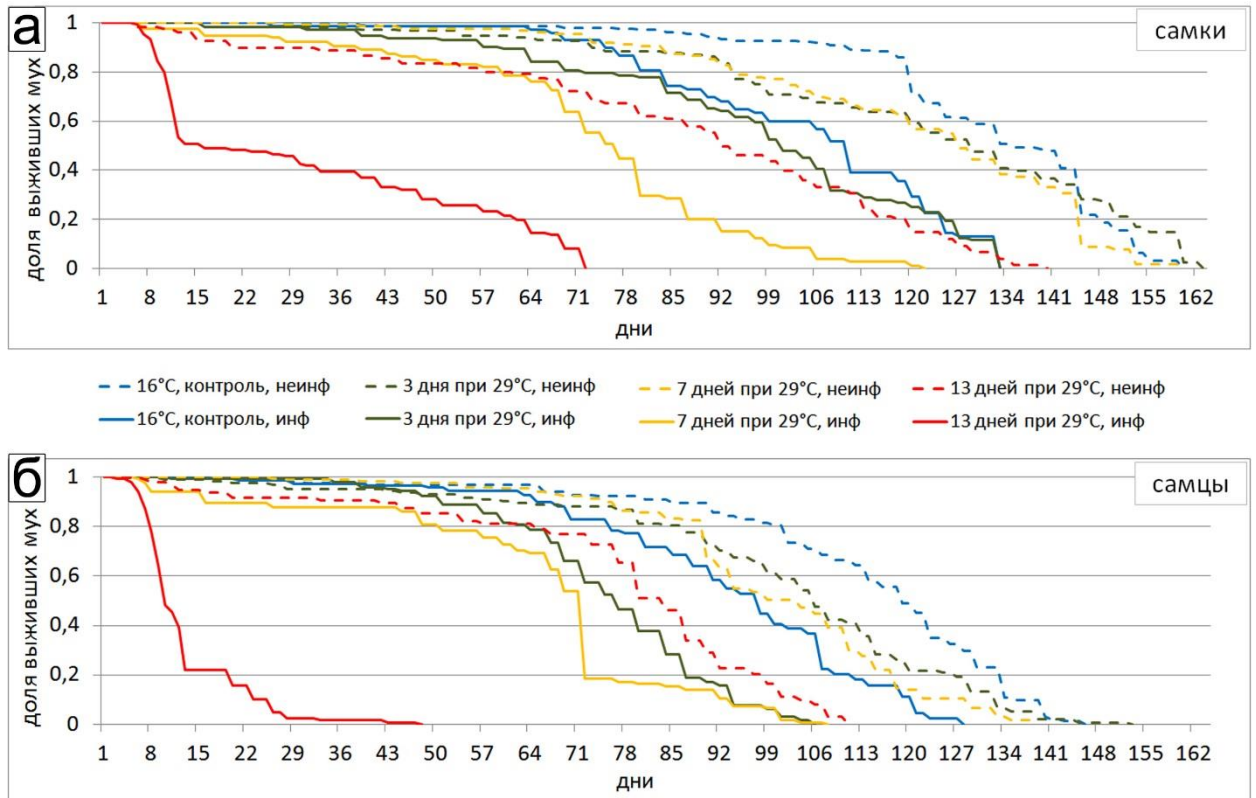


Рис. 12. Выживаемость самок (а) и самцов (б) не инфицированной и инфицированной *Wolbachia* линий мух, содержащихся при 16 °С постоянно, а также после обработки повышенной температурой 29 °С в течение 3, 7 и 13 дней и последующем переносе на 16 °С. В период с 7-го по 13-ый день происходит заметное снижение выживаемости инфицированных мух, проявляющееся существенно у самцов.

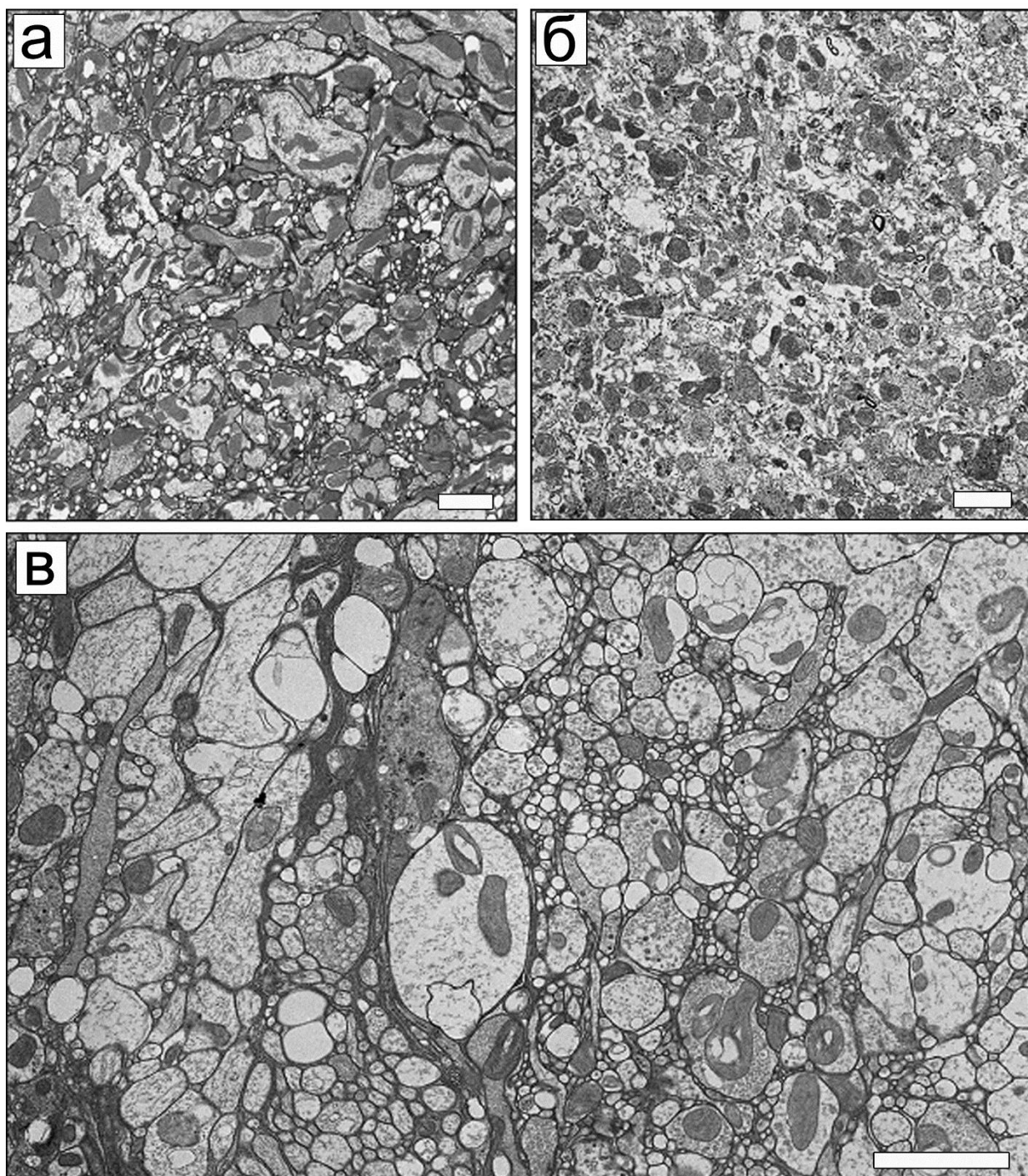


Рис. 13. Ультраструктура ткани мозга при разных типах фиксации. а – фиксация образцов смесью 1 % глутарового альдегида (GA) и 1 % формальдегида (FA) на 0,1 М Na-какодилатном буфере, постфиксация 1 % OsO<sub>4</sub>; б - 2,5 % GA + 2,5 % FA на 0,1 М Na-какодилатном буфере, постфиксация 1 % OsO<sub>4</sub>; в - 2,5 % GA на 0,1 М Na-какодилатном буфере, постфиксация 1 % OsO<sub>4</sub> (лучший вариант фиксации). Масштаб: 1 мкм.

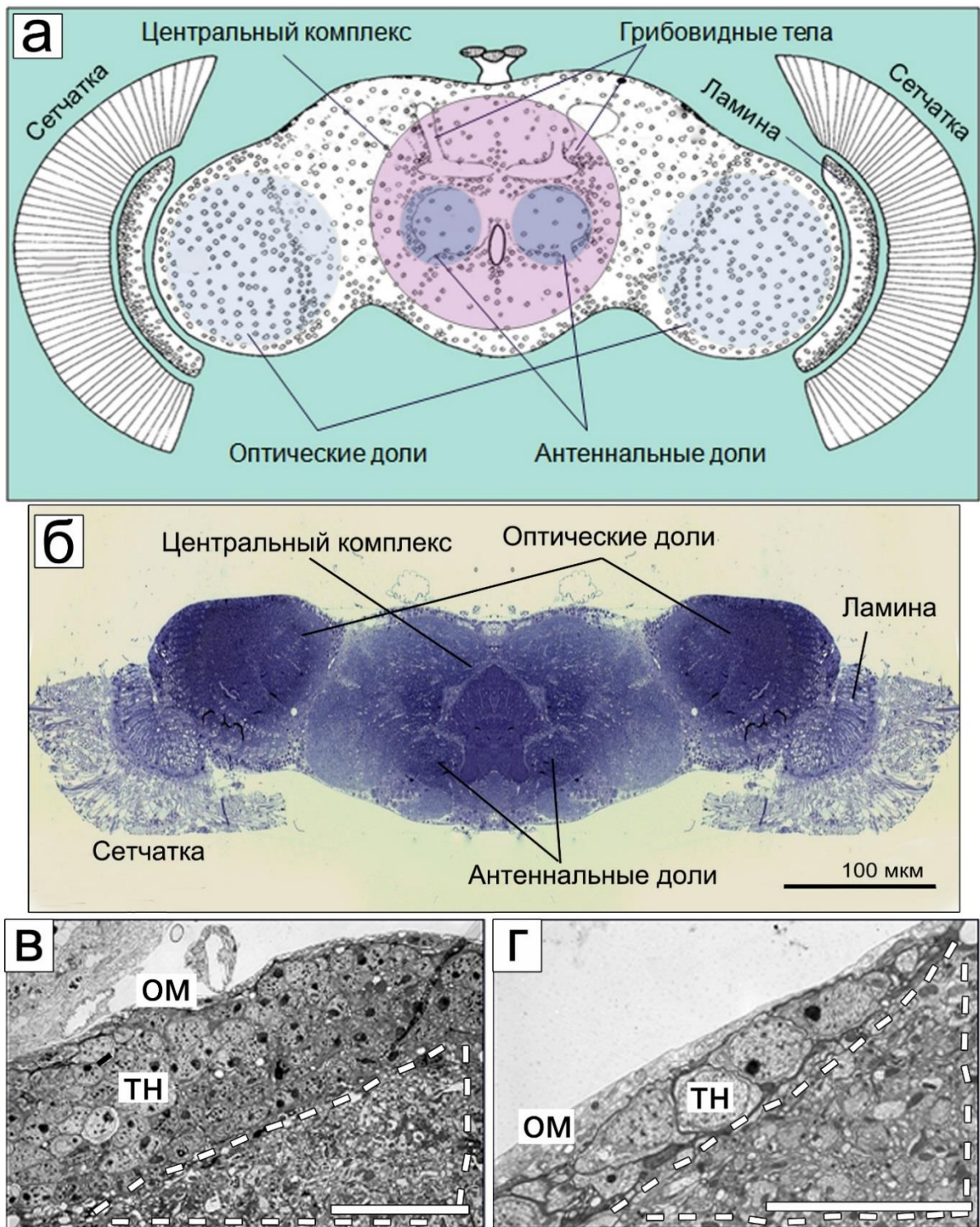


Рис. 14. Организация мозга *D. melanogaster* и расположение нервных клеток. а – схематическое изображение отделов мозга *D. melanogaster*; б – поперечный срез мозга мухи в световом микроскопе (окраска метиленовым синим); в, г – электронно-микроскопические фотографии периферических фрагментов оптической доли (в) и центрального отдела (г) мозга. ом – оболочка мозга, тн – тело нейрона, пунктиром обозначена область сплетения отростков нервных клеток (аксонов и дендритов). Масштаб: 50 мкм.



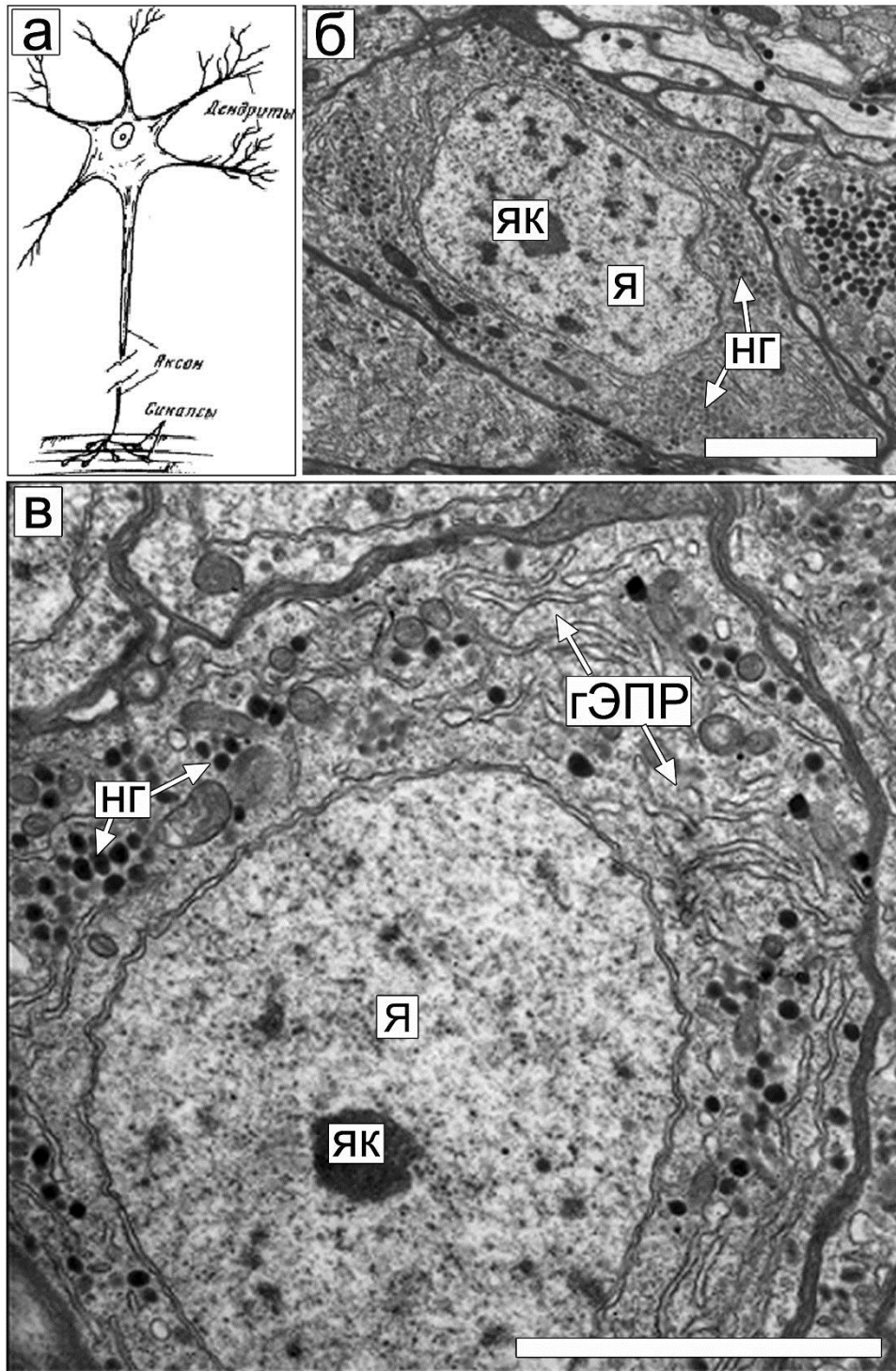


Рис. 15. Структурная организация клеток мозга *D. melanogaster*. Нейроны. а - схематическое изображение нейрона (Быков, 2002). б – срез тела нейрона в центральном отделе. Стрелками отмечены нейросекреторные гранулы; в – срез тела нейрона на периферии оптической доли. Стрелками отмечены мембраны гладкого эндоплазматического ретикула. я – ядро, як – ядрышко, гЭПР – гладкий эндоплазматический ретикулум, нг – нейросекреторные гранулы. Масштаб: 1 мкм.

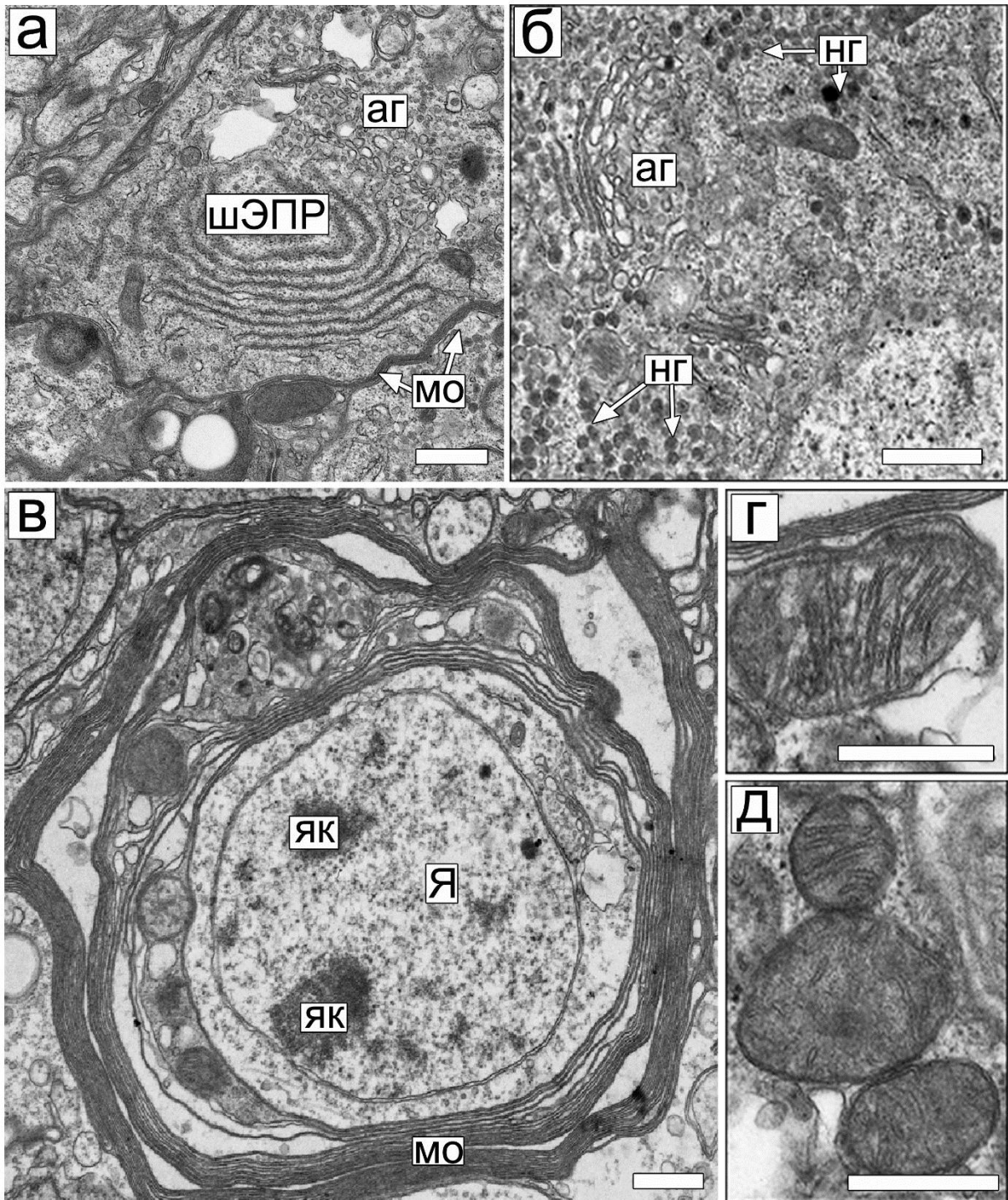


Рис. 16. Характеристика клеток мозга *D. melanogaster*. Нейроны.

а - срез нейрона на уровне перехода его тела в аксон. Видны крупные скопления шероховатого ЭПР и аппарата Гольджи; б – фрагмент тела нейрона с хорошо развитым аппаратом Гольджи; в – миелиновая оболочка, располагающаяся вокруг тела нейрона; г, д – типичные митохондрии с хорошо различимыми кристами. я – ядро, мо – миелиновая оболочка, шЭПР – шероховатый ЭПР, нг – нейросекреторные гранулы, аг – аппарат Гольджи, як - ядрышко. Масштаб:0,5 мкм.

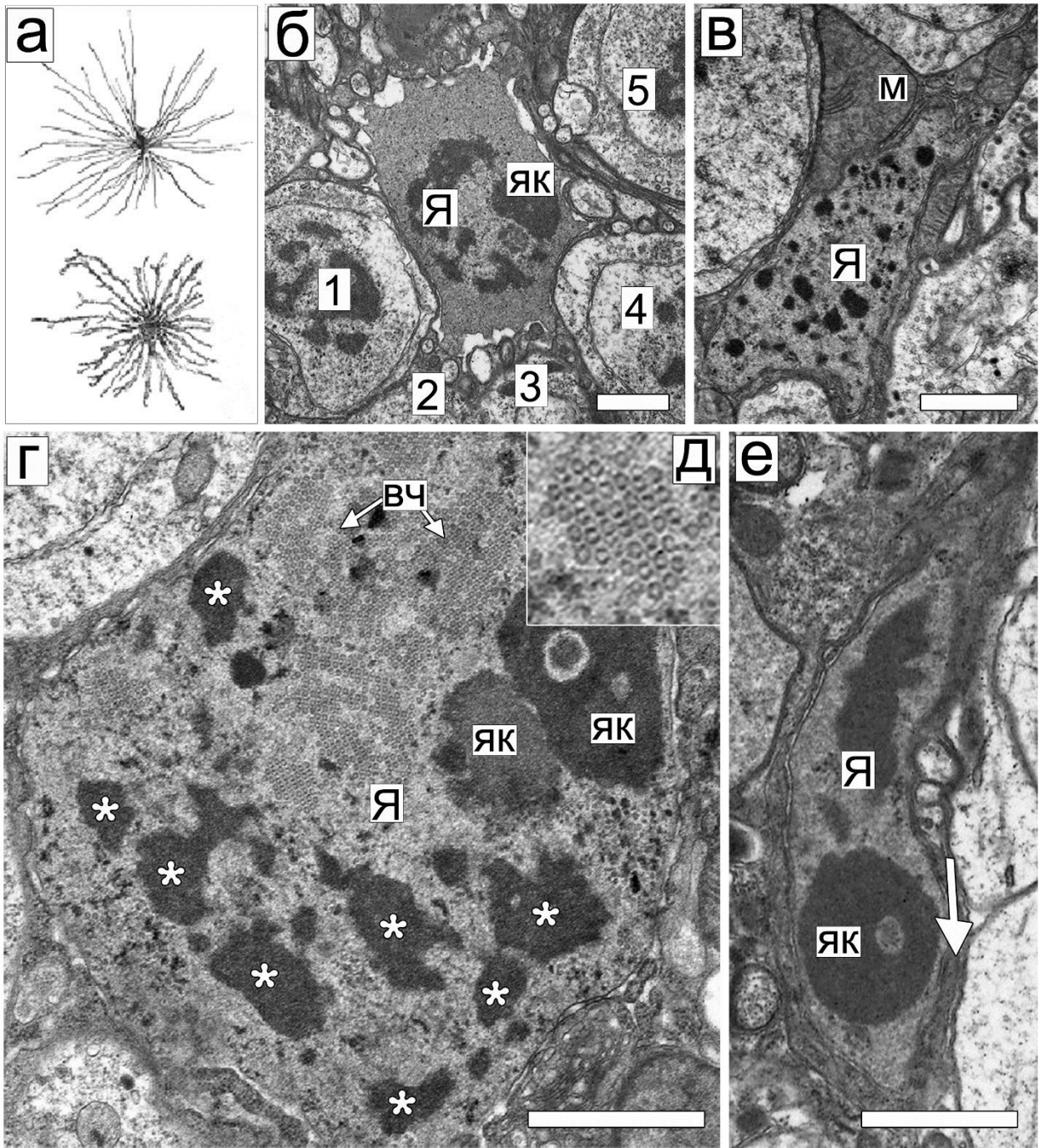


Рис. 17. Структурная организация клеток мозга *D. melanogaster*. Клетки глии. а - схематическое изображение клеток глии. б – срез клетки глии в окружении пяти нейронов. в – крупная митохондрия (м) в узкой цитоплазме клетки глии; г – срез ядра клетки глии с многочисленными глыбками компактного хроматина (обозначены белыми звёздочками); д – вид вирусных частиц под большим увеличением; е – контакт клетки глии с аксоном нейрона (белая стрелка). я – ядро, як – ядрышко, м – митохондрия, вч – вирусные частицы. Масштаб: 1 мкм.

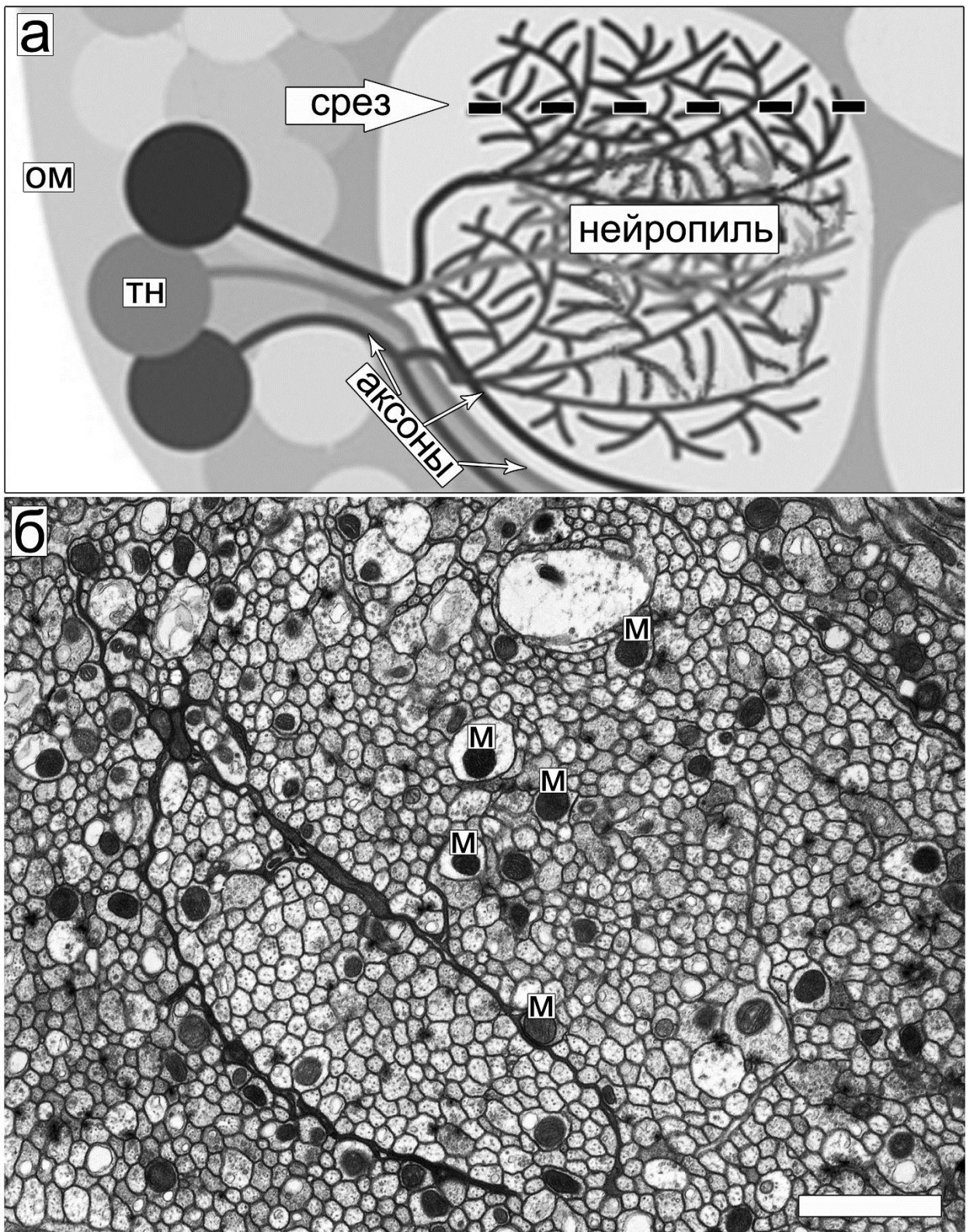


Рис. 18. Структурная организация клеток мозга *D. melanogaster*. Нейропили.  
 а - схематическое изображение нейропилы. б – поперечный срез участка нейропилы.  
 тн – тела нейронов, ом – оболочка мозга, м – митохондрия. Масштаб: 2 мкм.

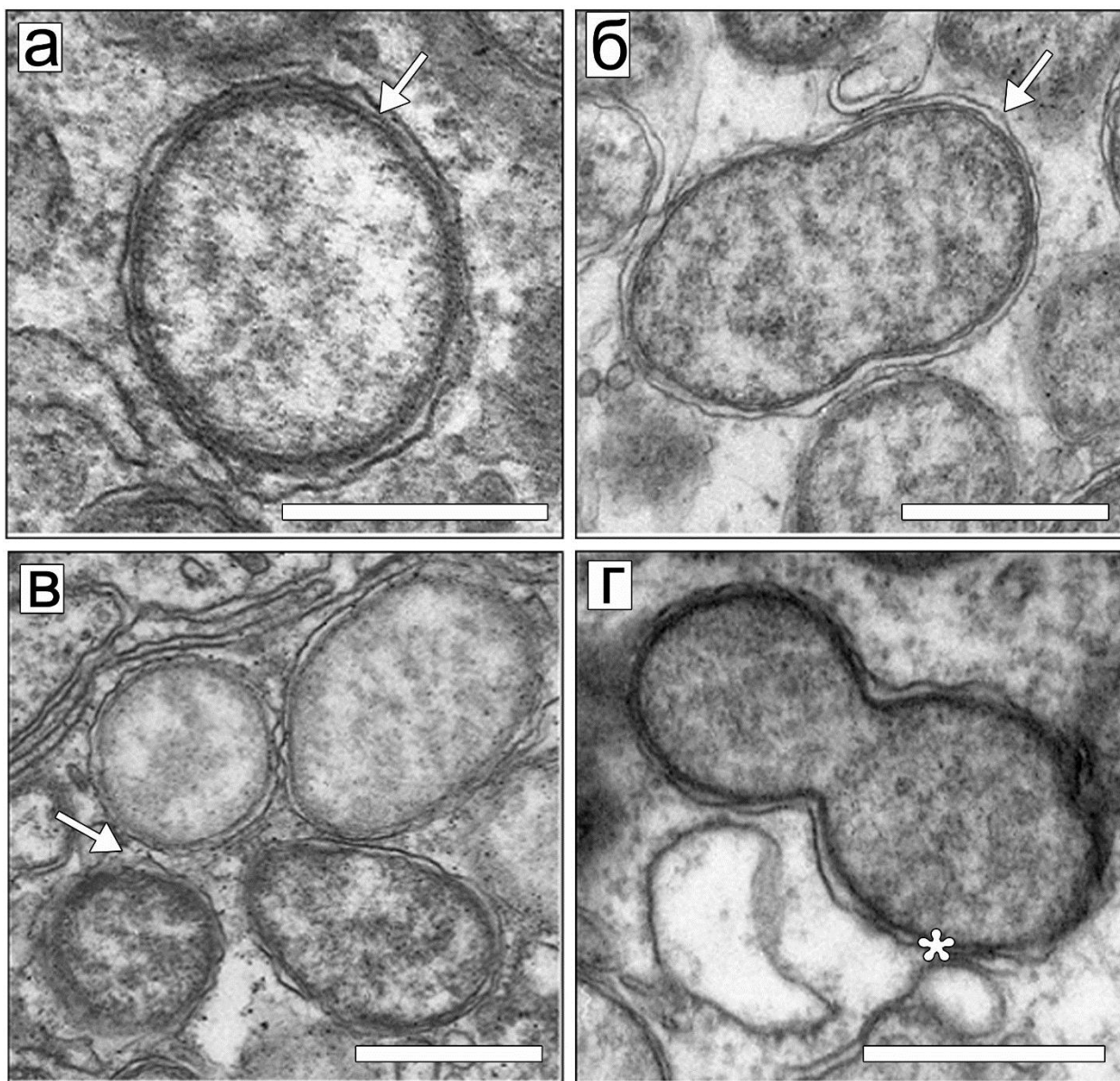


Рис. 19. Морфология бактерий *Wolbachia* в клетках мозга *D. melanogaster*. а, б – коккоидная (а) и палочковидная (б) формы бактерий, белой стрелкой отмечена трёхслойная оболочка; в – бактерии со светлым и тёмным матриксом. Белой стрелкой обозначен тесный контакт наружных мембран эндосимбионтов; г – делящаяся бактерия, контактирующая с гладким ЭПР (отмечено белой звёздочкой). Масштаб: 0,5 мкм.

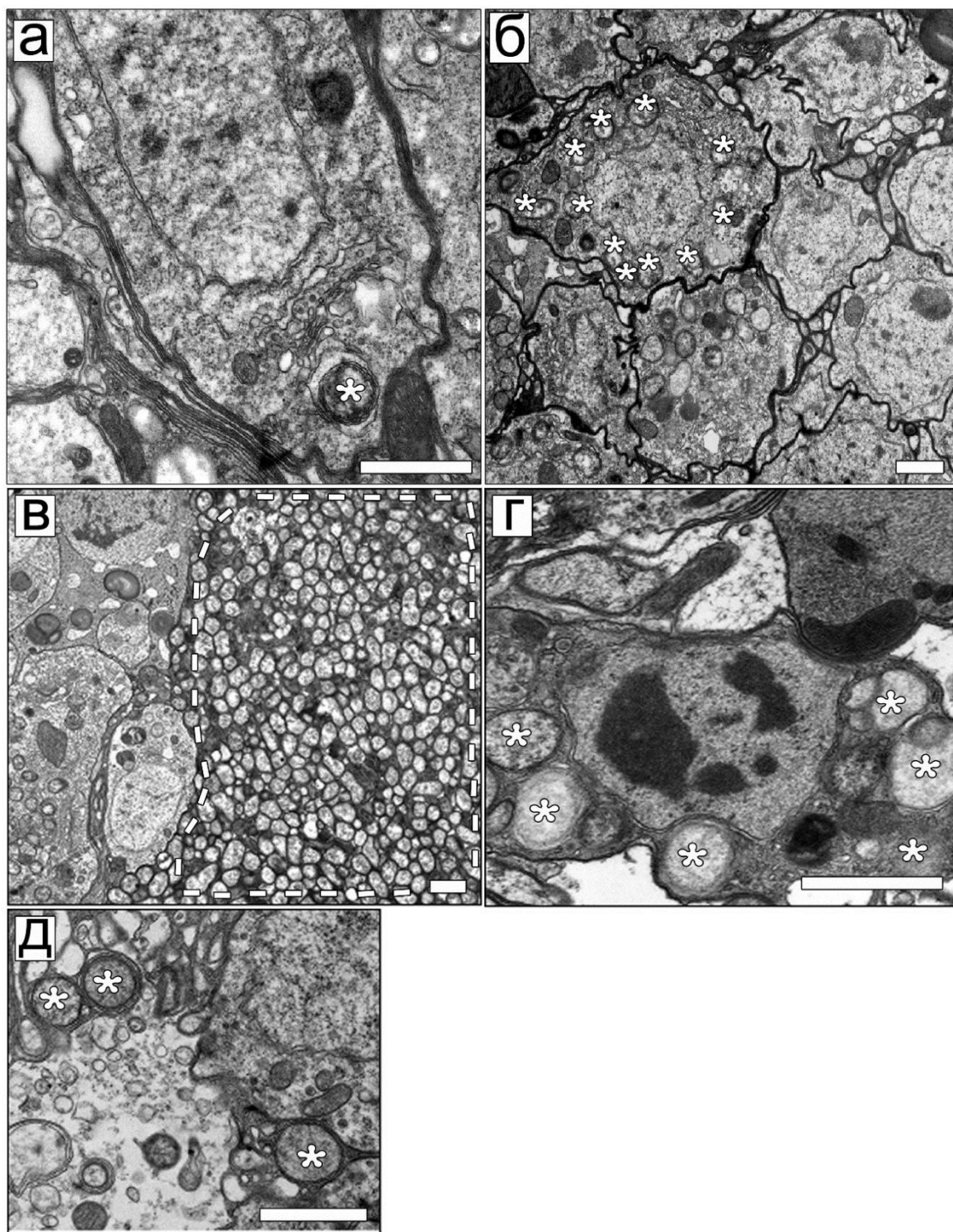


Рис. 20. Различная плотность *Wolbachia* в клетках мозга *D. melanogaster* и межклеточном пространстве. а – срез тела нейрона с одиночной бактерией в цитоплазме; б – срез тела нейрона, содержащий 11 бактерий в цитоплазме; в – срез нескольких нейронов, цитоплазма которых заполнена тесно расположенными бактериями (скопление бактерий обозначено пунктиром); г – бактерии в клетках глии; д – бактерии в межклеточном пространстве. Бактерии отмечены звёздочками. Масштаб: 1 мкм.

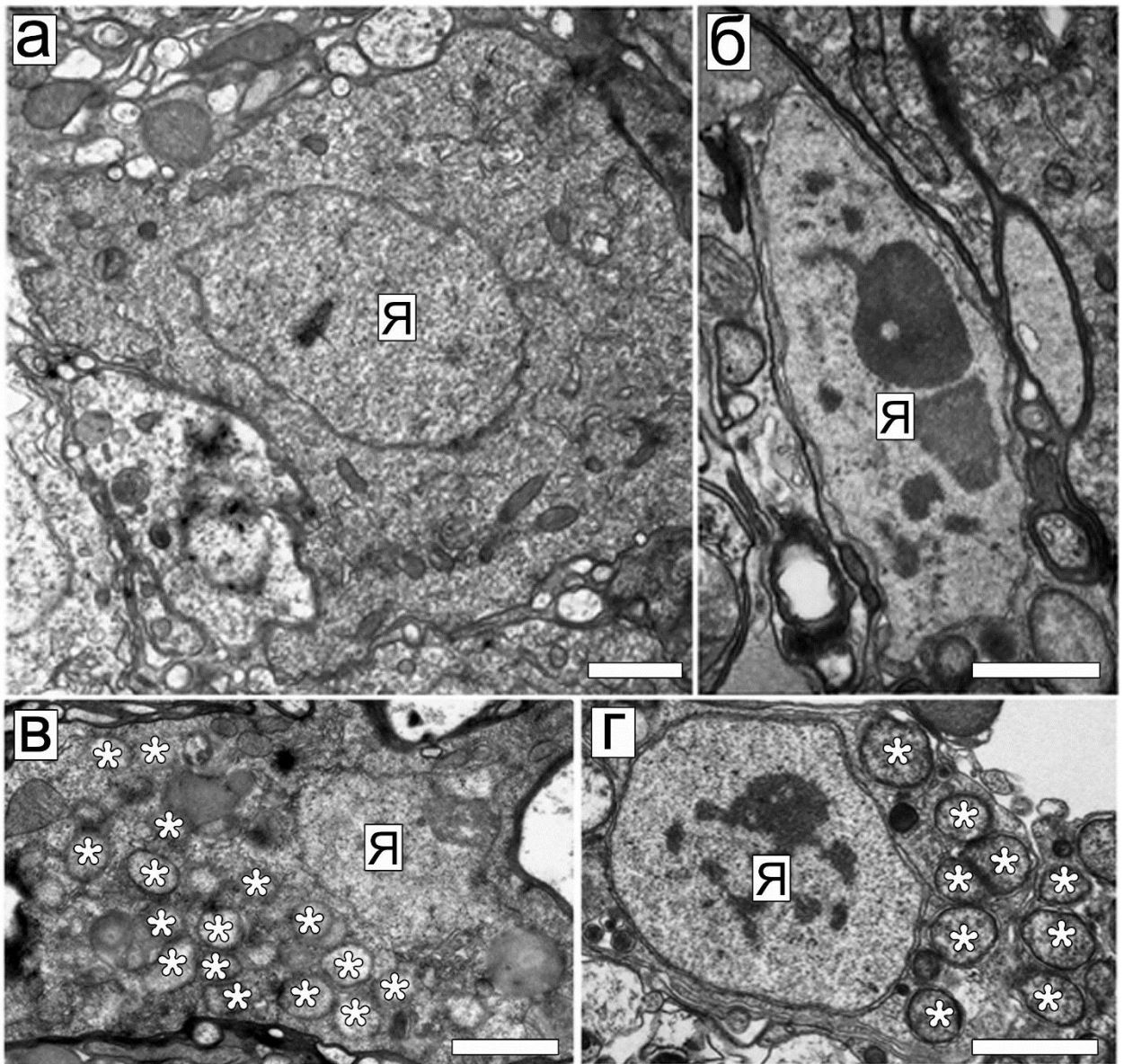


Рис. 21. Ультраструктура клеток мозга и распределение бактерий в нейронах и глии при содержании мух в течение 3 дней при повышенной температуре (29 °С).

а – срез через тело нейрона не заражённой бактериями мухи; б – срез через клетку глии не заражённой бактериями мухи; в – срез тела нейрона с цитоплазмой, заполненной бактериями; г – срез клетки глии с бактериями в цитоплазме. я – ядро. Масштаб: 1 мкм.

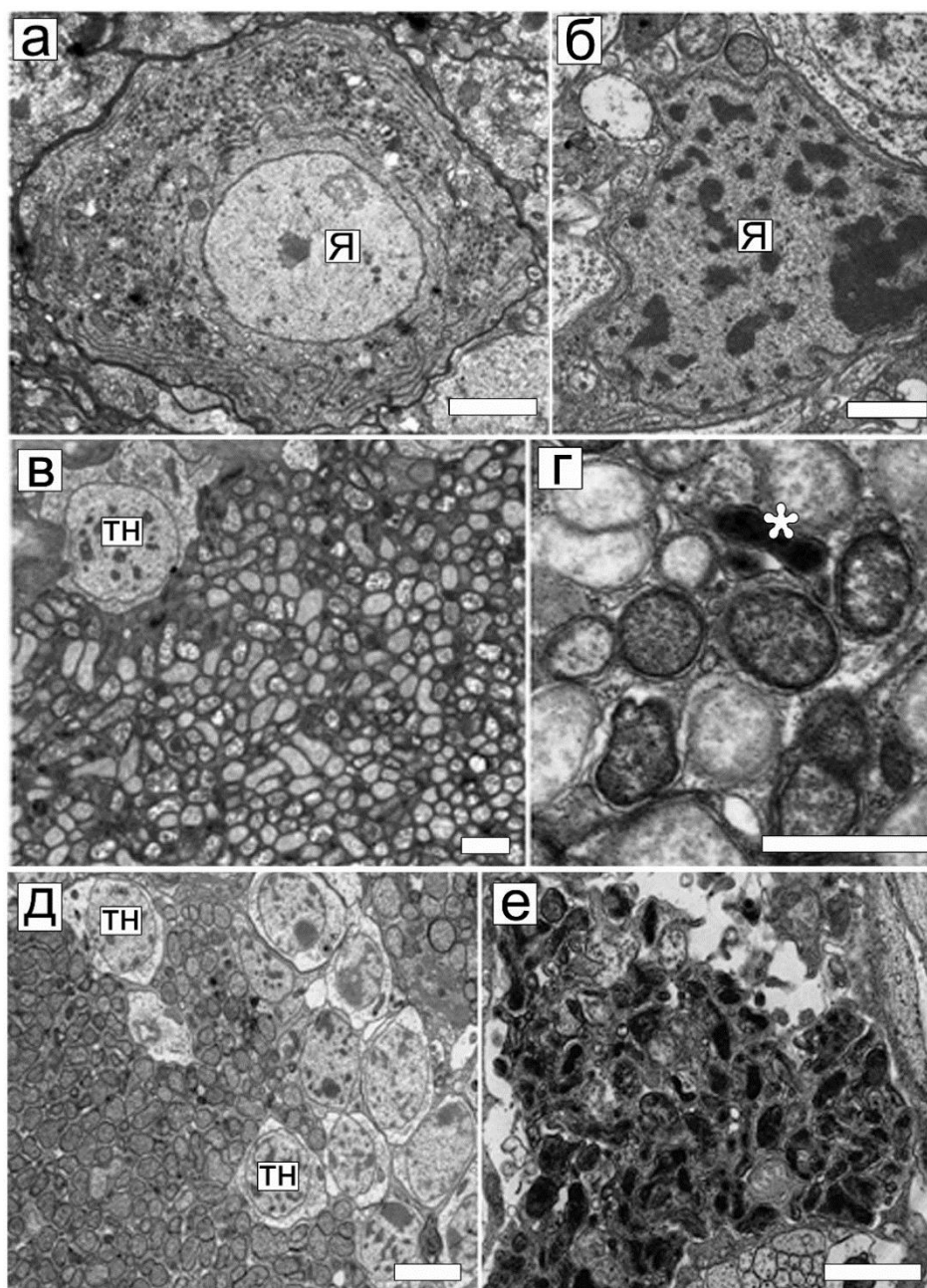


Рис. 22. Ультраструктура клеток мозга и распределение бактерий в нейронах и глии при содержании мух в течение 7 (в, г) и 13 (д, е) дней при 29 °С. а – срез через тело нейрона не заражённой бактериями мухи; б – срез через клетку глии не заражённой бактериями мухи; в – срез через крупное скопление бактерий, окружающее тело нейрона на 7 день воздействия 29 °С; г – бактерии с разной плотностью матрикса в цитоплазме нейрона; электронно-плотная палочковидная структура (отмечена звёздочкой); д - срез через крупное скопление бактерий, среди тел нейронов на 13 день воздействия 29 °С; е – большое скопление электронно-плотных палочковидных структур в межклеточном пространстве. я – ядро, тн – тела нейронов. Масштаб: 1 мкм.



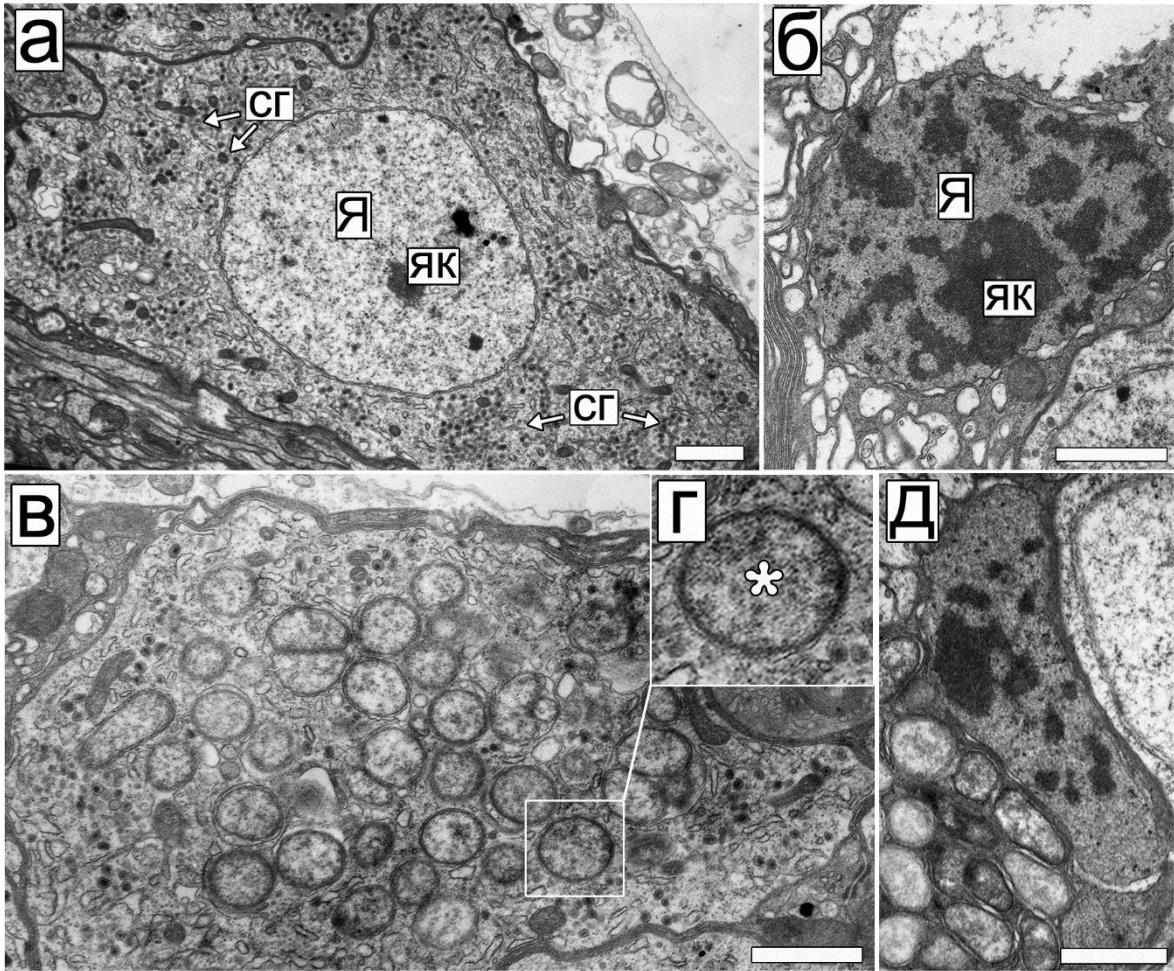


Рис. 23. Ультраструктура клеток мозга и распределение бактерий в нейронах и клетках глии при постоянном содержании мух при 16 °С. а, б – тело нейрона и клетка глии, соответственно, не заражённой бактериями мухи; в - д – распределение бактерий в теле нейрона (в, г) и клетке глии (д); на г бактерия обозначена звездочкой. я – ядро, як – ядрышко, нг – нейросекреторные гранулы. Масштаб – 1 мкм.

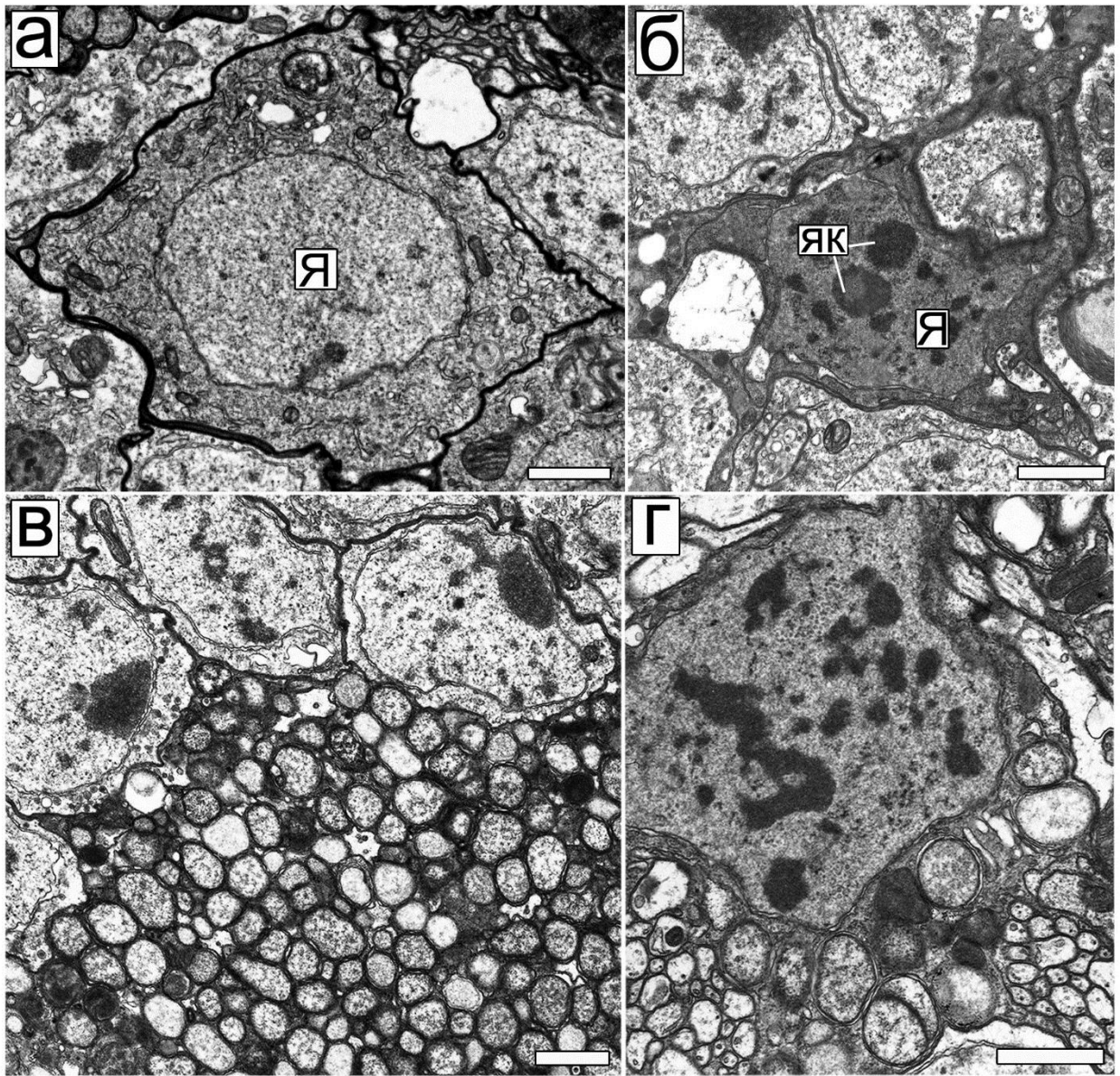


Рис. 24. Ультраструктура клеток мозга и распределение бактерий в нейронах и клетках глии после предварительной обработки мух 29 °С в течение 3 дней и последующем переносе на 16 °С. а, б – тело нейрона и клетка глии, соответственно, не заражённой бактериями мухи; в, г – распределение бактерий в теле нейрона и клетке глии, соответственно; я – ядро, як – ядрышко. Масштаб – 1 мкм.

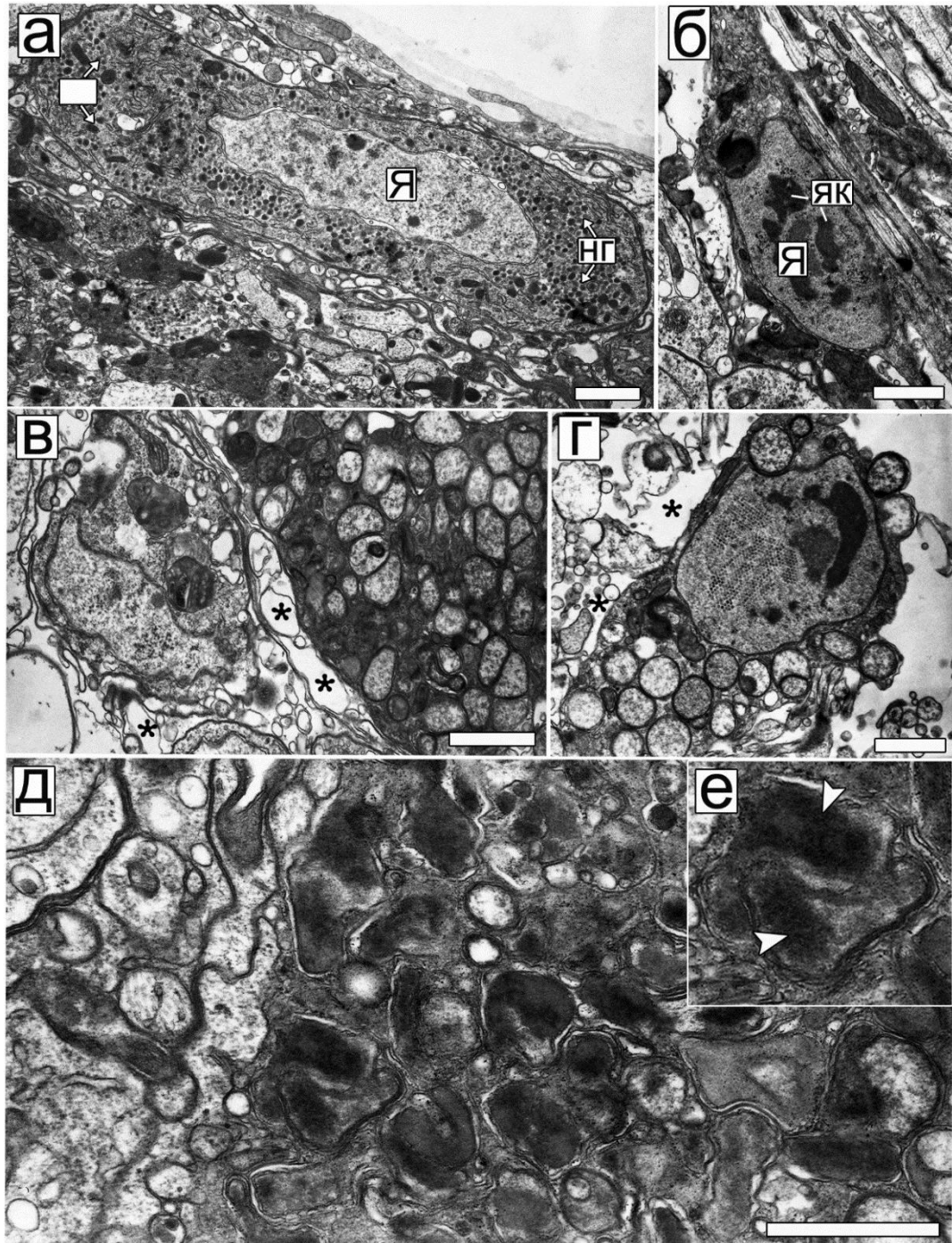


Рис. 25. Ультраструктура клеток мозга и распределение бактерий в нейронах и клетках глии после предварительной обработки мух 29 °С в течение 7 дней и последующем переносе на 16 °С. а, б – тело нейрона и клетка глии, соответственно, не заражённой бактериями мухи; в, г – распределение бактерий в теле нейрона и клетке глии, соответственно; видны расширенные межклеточные полости; д – скопление бактерий, содержащих большое количество электронно-плотных структур; е – увеличенное изображение электронно-плотных структур ( ). я – ядро, як – ядрышко, нг – нейросекреторные гранулы. Масштаб – 1 мкм.

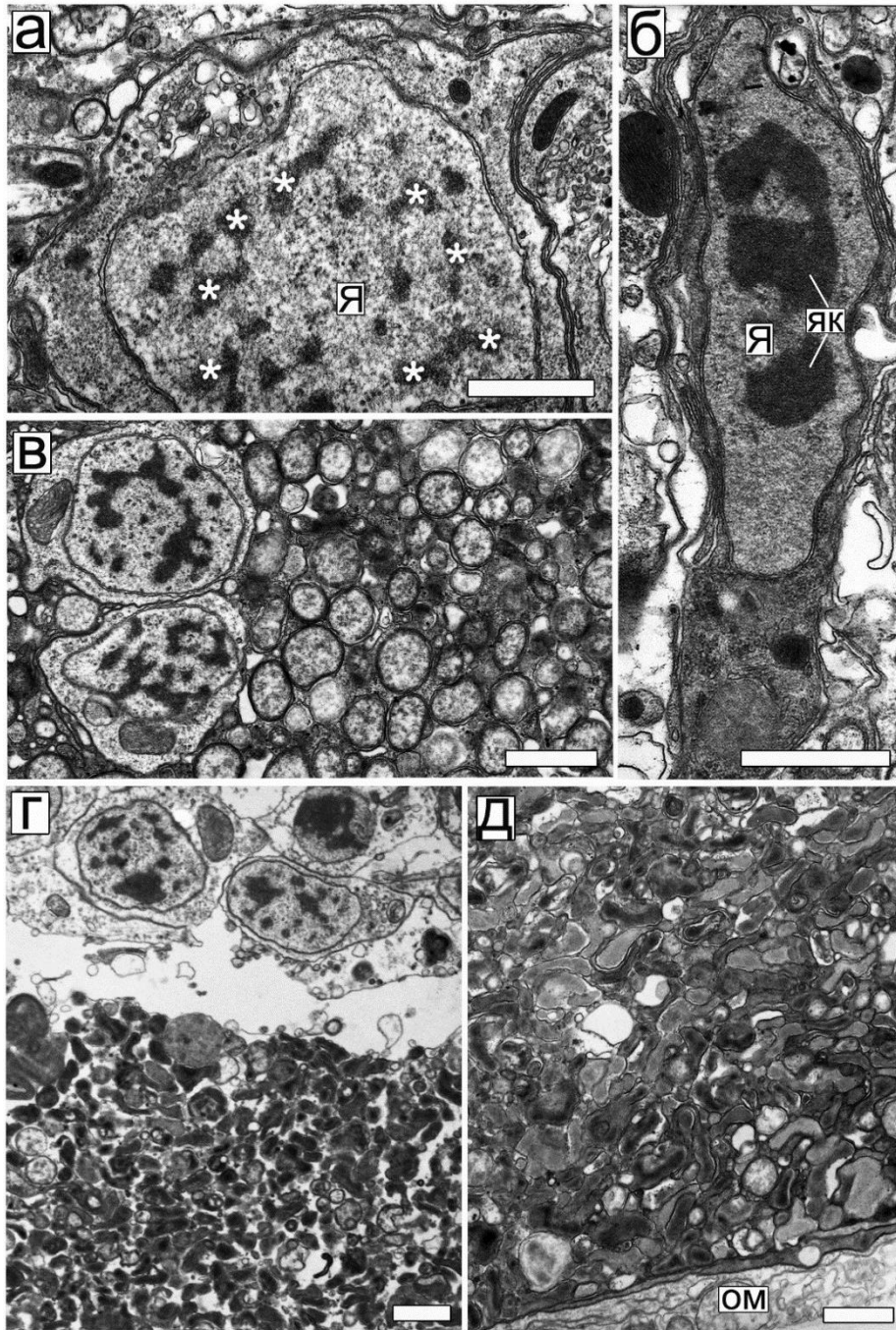


Рис. 26. Ультраструктура клеток мозга и распределение бактерий в нейронах и клетках глии после предварительной обработки 29 °С в течение 13 дней и последующем переносе на 16 °С. а, б – тело нейрона и клетка глии, соответственно, не заражённой бактериями мухи; белыми звёздочками обозначены глыбки компактного хроматина; в – распределение бактерий в теле нейрона; бактерии обозначены звёздочками; г, д – крупные скопления бактерий в виде электронно-плотных структур под оболочкой мозга мух. Видны разрушающиеся, со светлой цитоплазмой, нейроны (г). я – ядро, як – ядрышко, ом – оболочка мозга. Масштаб – 1 мкм.

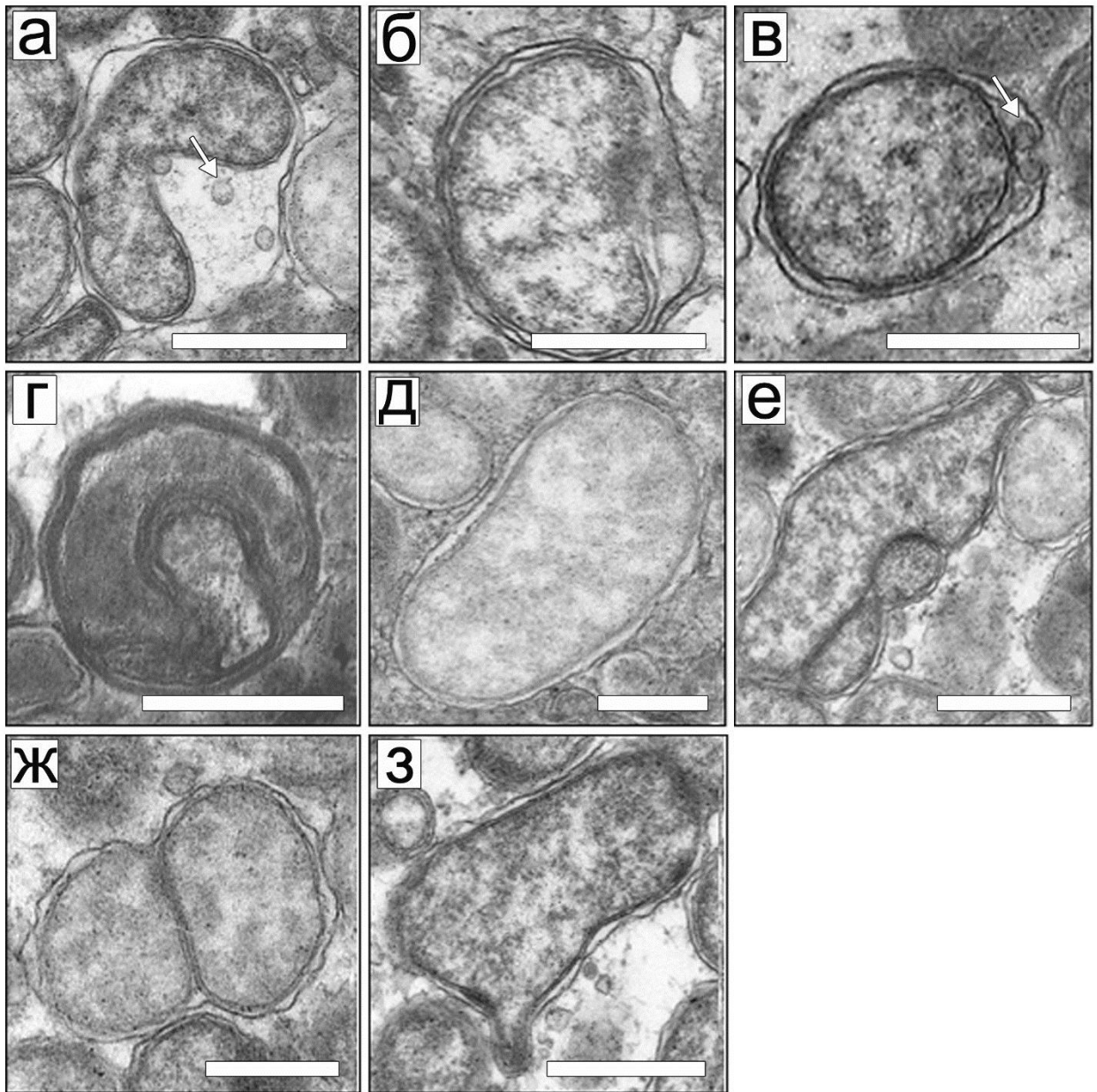


Рис. 27. Морфологические типы *Wolbachia* с нарушениями типичного строения, наблюдаемые в клетках мозга при различных температурах. а, б – бактерии с расширенным вакуолеподобным пространством между клеточной стенкой и наружной плазматической мембраной (стрелка указывает на пузырьки); в – везикуляция мембран бактерии (стрелка); г – бактерия с темным матриксом, окруженная несколькими мембранами; д – аномально крупная бактерия со светлым матриксом; е – бактерия атипичной формы, лежащая под общей мембраной с делящейся бактерией; ж – контактирующие бактерии, окруженные общей наружной мембраной; з – бактерия с выпячиванием клеточной оболочки. Масштаб: 0,5 мкм.

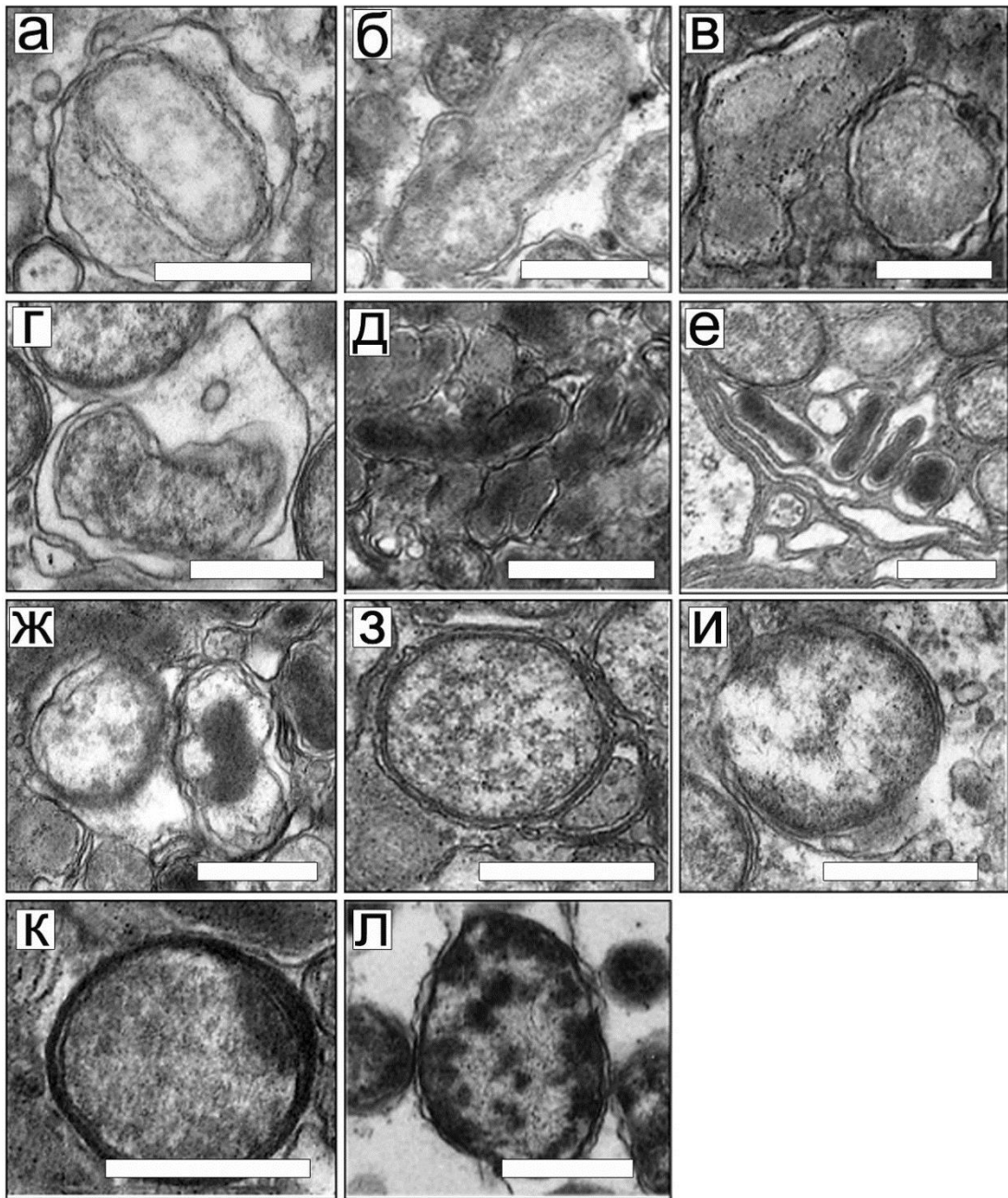


Рис. 28. Деградирующие формы бактерий *Wolbachia*, наблюдаемые в цитоплазме клеток и внеклеточном пространстве мозга мух при различных температурных режимах. а – образование многочисленных мембран вокруг бактерии; б, в – бактерии с гомогенным матриксом и нарушением целостности оболочек; г – бактерия внутри крупной вакуоли; д – палочковидные электронно-плотные структуры; е – формирование одиночных электронно-плотных структур вблизи бактерий; ж – палочковидное уплотнение матрикса в центре бактерии; з – бактерия, контактирующая с плотным тельцем; и – *Wolbachia* с разреженным матриксом; к – бактерия, окружённая плотной оболочкой; л – бактерия, содержащая электронно-плотные скопления в разных участках матрикса. Масштаб: 0,5 мкм.

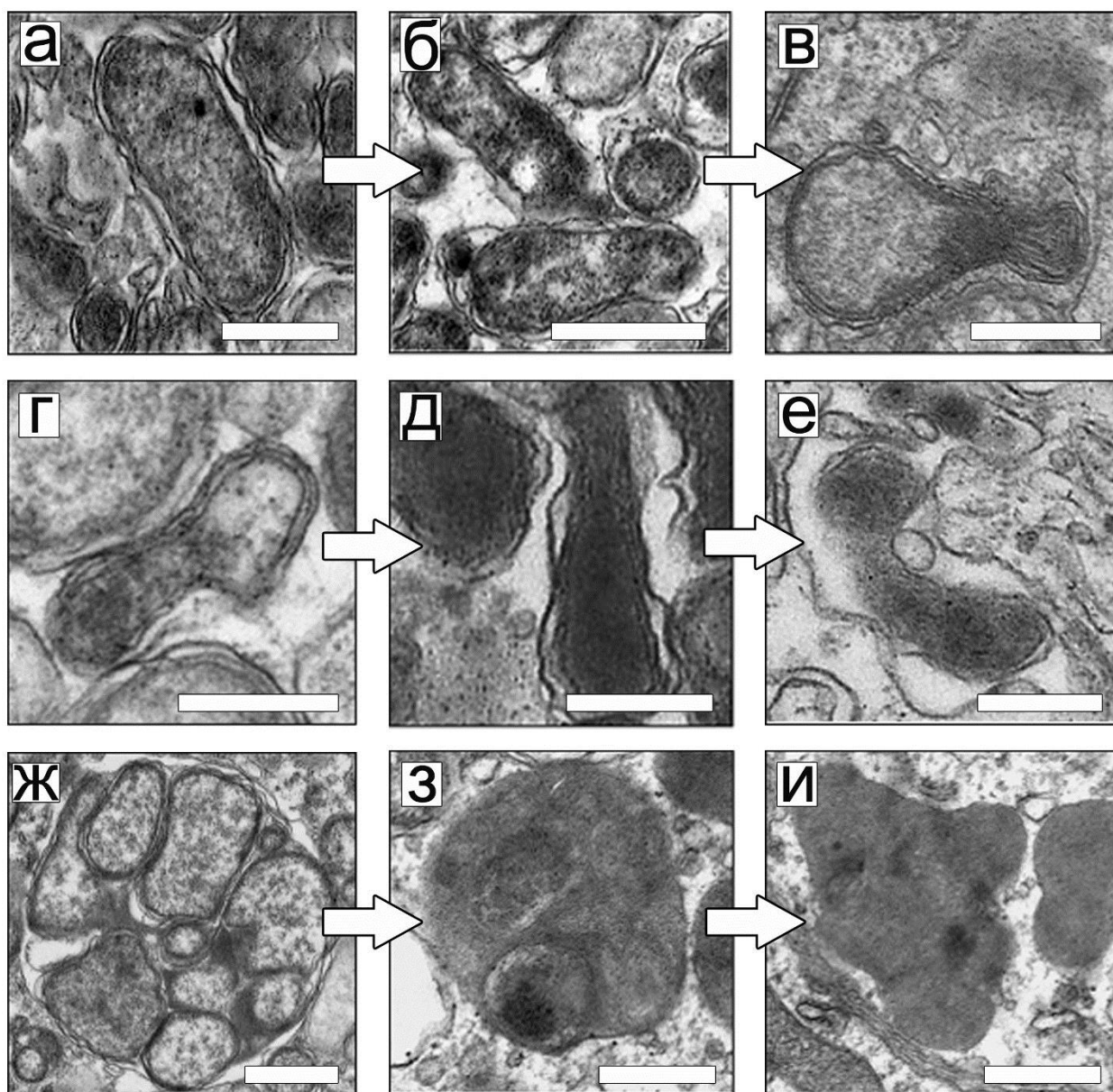


Рис. 29. Предполагаемые переходные формы бактерий в процессе превращения одиночных бактерий в электронно-плотные палочковидные структуры (а - е), либо групп бактерий в крупные образования с гомогенным матриксом (ж - и). а – одиночное уплотнение в матриксе бактерии; б – множественные электронно-плотные участки в матриксе бактерий; в – уплотнение участка матрикса в месте сужения бактерии; г – образование палочковидной структуры; д – уплотнение матрикса по всему объёму бактерии; е – формирование вакуоли вокруг плотной структуры и её разрушение; ж – группа бактерий, лежащая под общей мембраной; з – деградация бактерий путём их лизиса; и – формирование электронно-плотной структуры. Масштаб: 0,5 мкм.

Таблица 5. Характеристика распределения бактерий в клетках и внеклеточном пространстве мозга *D. melanogaster* при различных температурных режимах.

Температурные режимы содержания мух	скопления бактерий в клетках на периферии и мозга	полностью заполненные бактериями и нейроны	бактерии под оболочкой мозга во внеклеточном пространстве	гибнущие клетки	крупные участки мозга, заполненные бактериями
25 °С	+	+	+	0	0
16 °С - 30 дней	+	+	+	0	0
29 °С – 3 дня	+	+	+	0	+
29 °С – 3 дня, перенос на 30 дней при 16 °С	++	++	++	0	+
29 °С – 7 дней	++	++	+	0	++
29 °С – 7 дней, перенос на 30 дней при 16 °С	++	++	++	0	++
29 °С – 13 дней	+++	+++	+++	+	++++
29 °С – 13 дней, перенос на 30 дней при 16 °С	+++	+++	+++	+	++++

Количество клеток мозга с разной плотностью бактерий, число гибнущих клеток мозга, а также степень выхода бактерий из клеток при 25 °С были условно приняты за норму и обозначались одним крестом.



Таблица 6. Присутствие делящихся бактерий, бактерий на разных стадиях деградации и разрушенных бактерий в клетках мозга при различных температурных режимах.

Температурные режимы содержания мух	делящиеся бактерии	бактерии под общей внешней мембраной	электронно-плотные палочковидные бактерии	бактерии с разреженным матриксом	разрушенные бактерии
25 °С	+	0	+	+	+
16 °С - 30 дней	+	++	+	+	+
29 °С – 3 дня	+	0	+	++	++
29 °С – 3 дня, перенос на 30 дней при 16 °С	+	+	++	++	++
29 °С – 7 дней	+	+	++	++	++
29 °С – 7 дней, перенос на 30 дней при 16 °С	+	+	++	++	++
29 °С – 13 дней	+	+	++++	+	++
29 °С – 13 дней, перенос на 30 дней при 16 °С	+	+	++++	+	++

Частота встречаемости разных форм деградирующих или гибнущих бактерий в клетках мозга при 25 °С были условно приняты за норму и обозначались одним крестом.

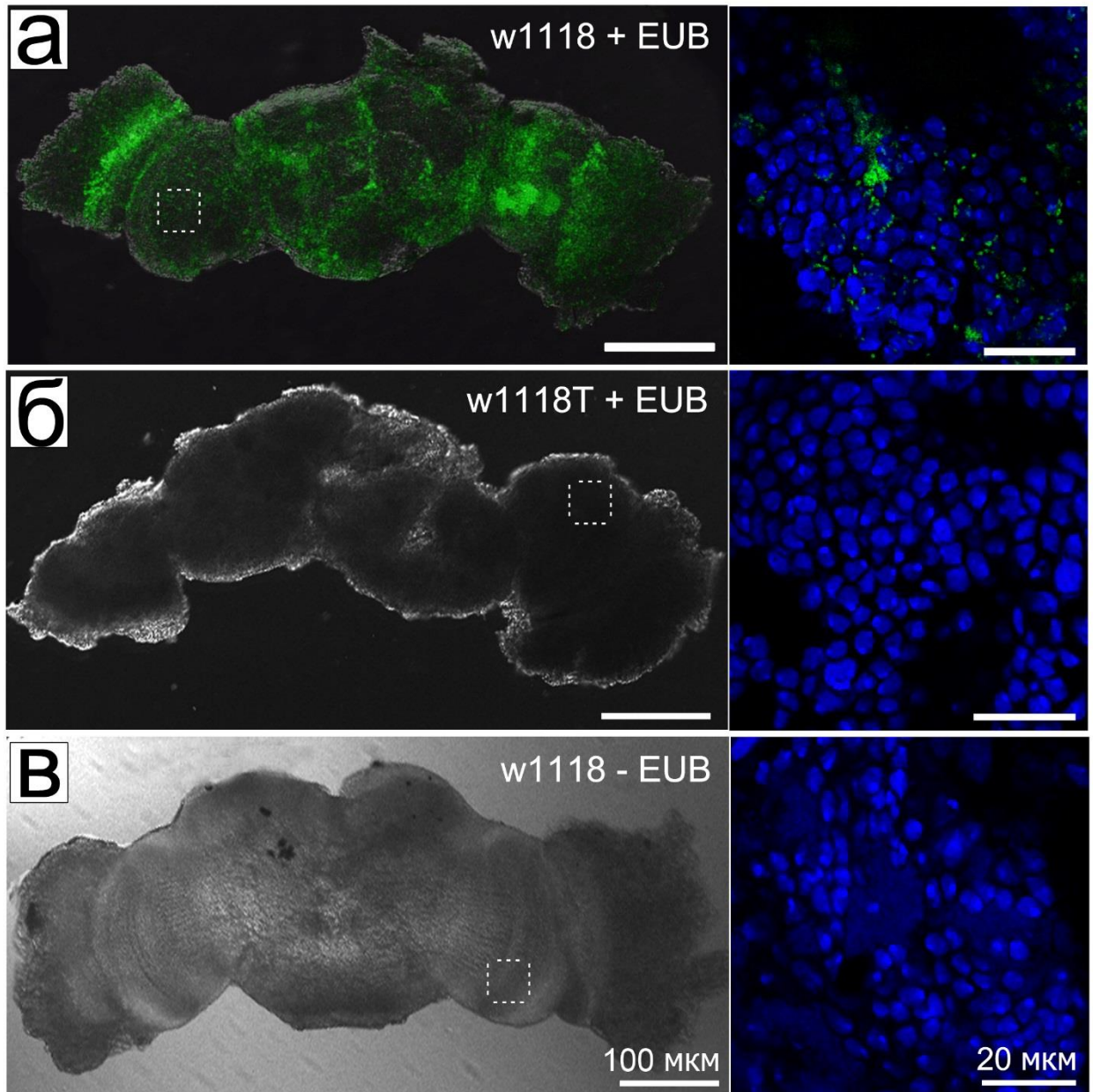


Рис. 30. Флуоресцентная гибридизация *in situ* мозга взрослых *D. melanogaster*, инфицированных *Wolbachia* и содержащихся при 25 °С, с использованием универсальной бактериальной пробы EUB338 (зелёный). (а) флуоресцентная гибридизация *in situ* мозга инфицированной *Wolbachia* мухи. (б) мозг неинфицированной мухи. (с) флуоресцентная гибридизация *in situ* инфицированной *Wolbachia* мухи без добавления пробы EUB338. Левая колонка: объединённое изображение в проходящем свете и флуоресцентного канала (EUB338, зелёный); правая колонка: оптический срез, демонстрирующий участок оптической доли с левой колонки (квадрат пунктиром) на большом увеличении; ядра окрашены DAPI (синий).

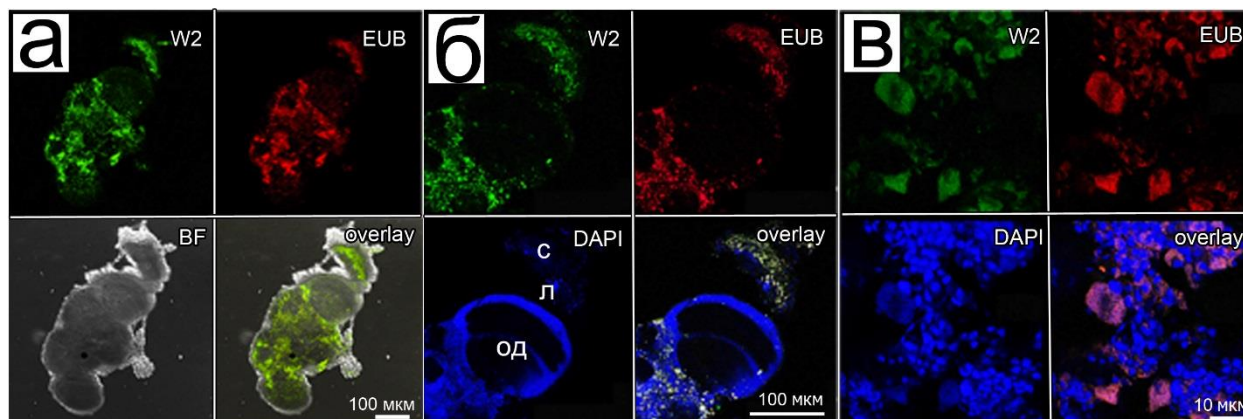


Рис. 31. Флуоресцентная гибридизация *in situ* мозга взрослых *D. melanogaster*, инфицированных *Wolbachia* и содержащихся при 25 °С, с использованием двух проб. (а) целый мозг мухи. (б) оптическая доля (од), ламина (л) и сетчатка (с). (в) область подглоточного ганглия. Верхняя панель: *Wolbachia*-специфичная проба W2 (W2, зелёный) и универсальная бактериальная проба EUB338 (EUB, красный). Нижняя панель: (а) проходящий свет (BF) и наложение всех каналов (объединённые оптические срезы); (б, в) окрашенные DAPI ядра (DAPI, синий) и наложение флуоресцентных каналов.

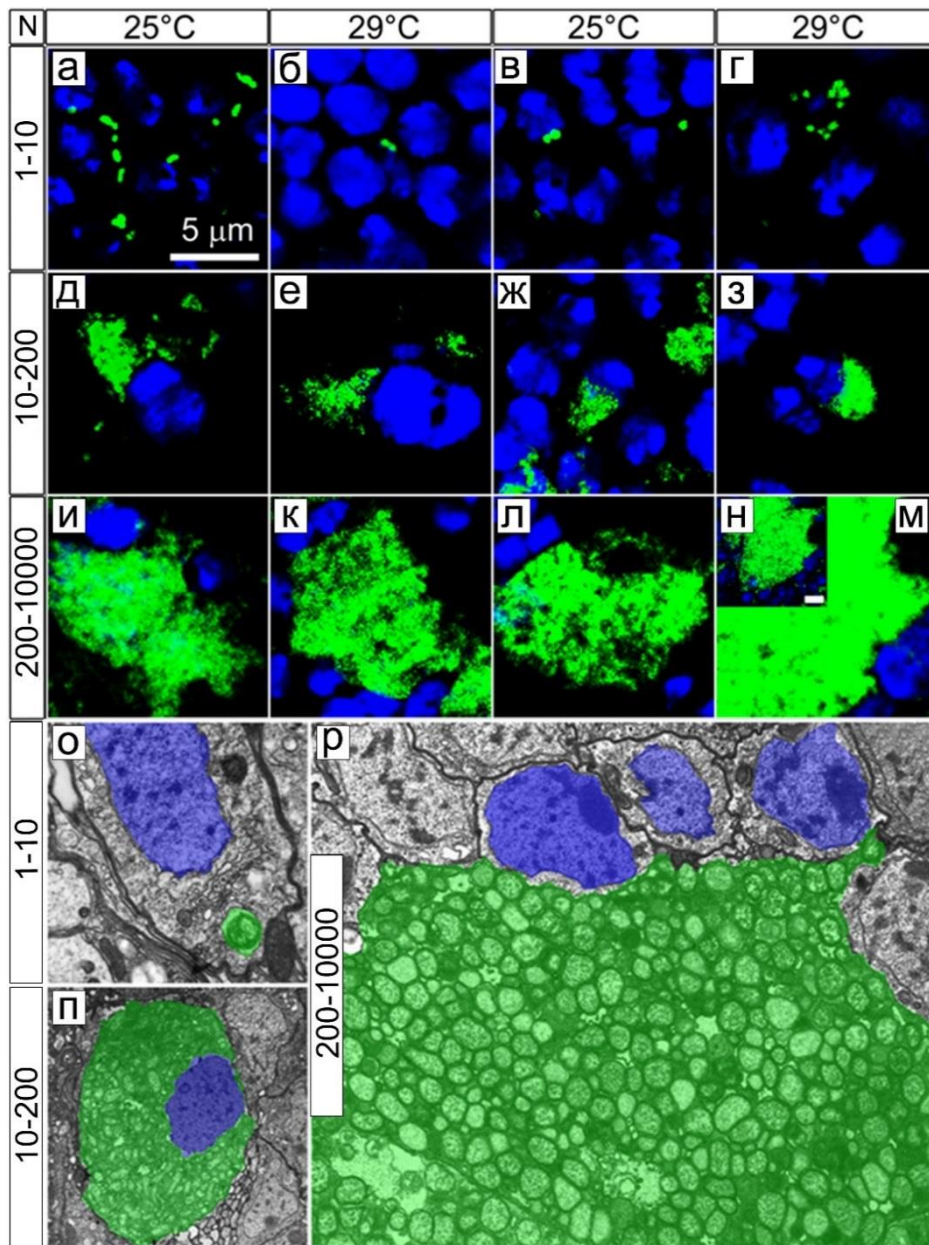


Рис. 32. Различающиеся по плотности бактерий клетки мозга *D. melanogaster*, содержащиеся при 25 °С (а, в, д, ж, и, л) или 29 °С. (б, г, е, з, к, м, н) в конфокальном (а – м) и электронном микроскопе (о – р). б – е, о – клетки мозга, содержащие 1-10 бактерий на срез клетки; д – з, п – клетки мозга, содержащие 10-200 бактерий на срез клетки; и – н, р – несколько клеток мозга, заполненных 200-10000 бактериями. Видно существенное увеличение крупных скоплений бактерий в клетках мозга мух при 29 °С. Зелёный цвет – *Wolbachia*, окрашенные с помощью пробы EUB338 (а–н), или искусственно покрашенные аналогичным цветом бактерии на электронно-микроскопических снимках (о–р); синий цвет – ядра, окрашенные DAPI (а–н) или искусственно покрашенные аналогичным цветом бактерии на электронно-микроскопических снимках (о–р).

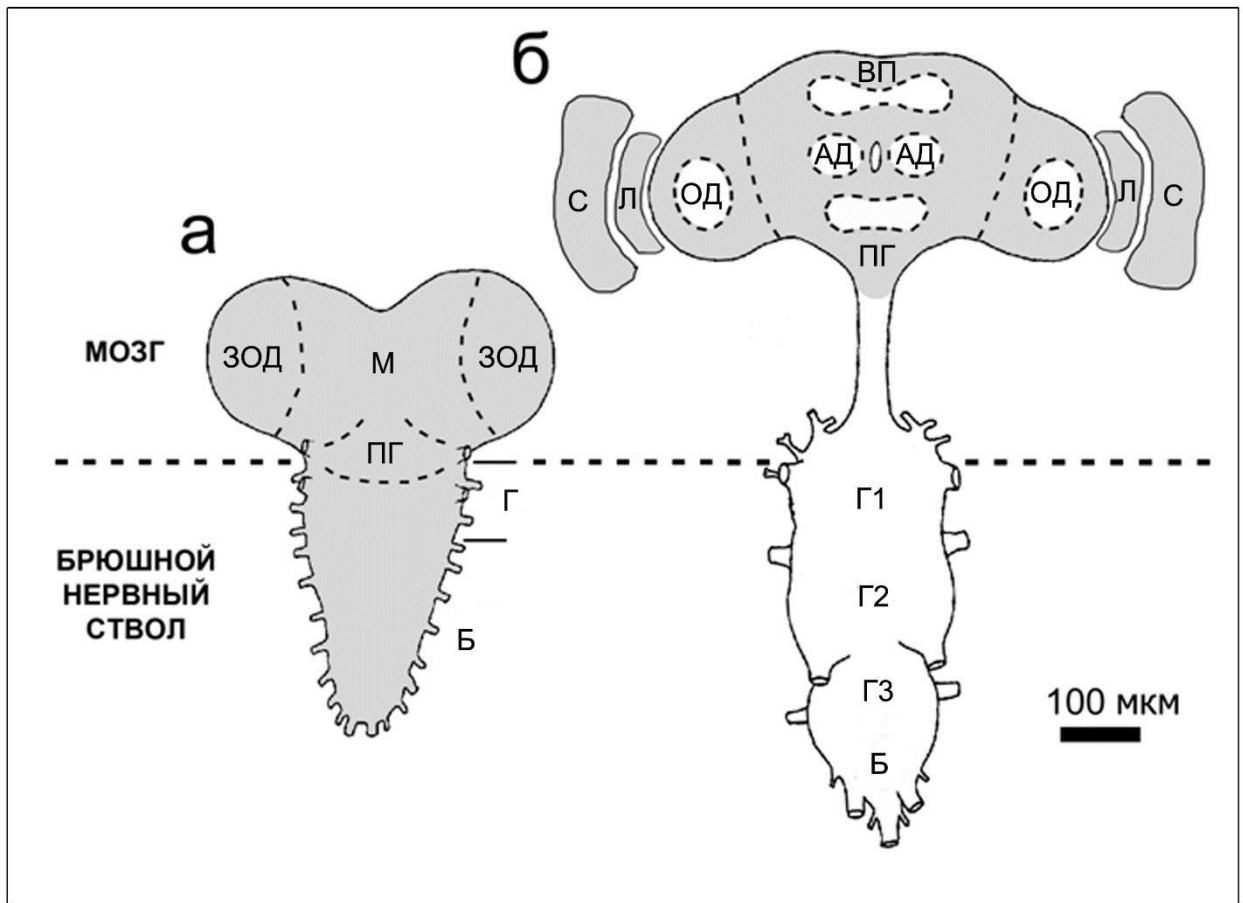


Рис. 33. Схема организации центральной нервной системы личинки третьего возраста (а) и взрослой (б) *D. melanogaster* (модифицировано из Truman, 1990). Серым цветом обозначены области, вошедшие в анализ титра бактерий и их распределения. ЗОД – зачатки оптических долей; М – центральный мозг; ПГ – подглоточный ганглий; ВП – верхний протоцеребрум; АД – антеннальная доля; ОД – оптическая доля; Л – ламина; С – сетчатка; Б – брюшные нейромеры; Г – грудные нейромеры; Г1 – переднегрудные нейромеры; Г2 – среднегрудные нейромеры; Г3 – заднегрудные нейромеры.

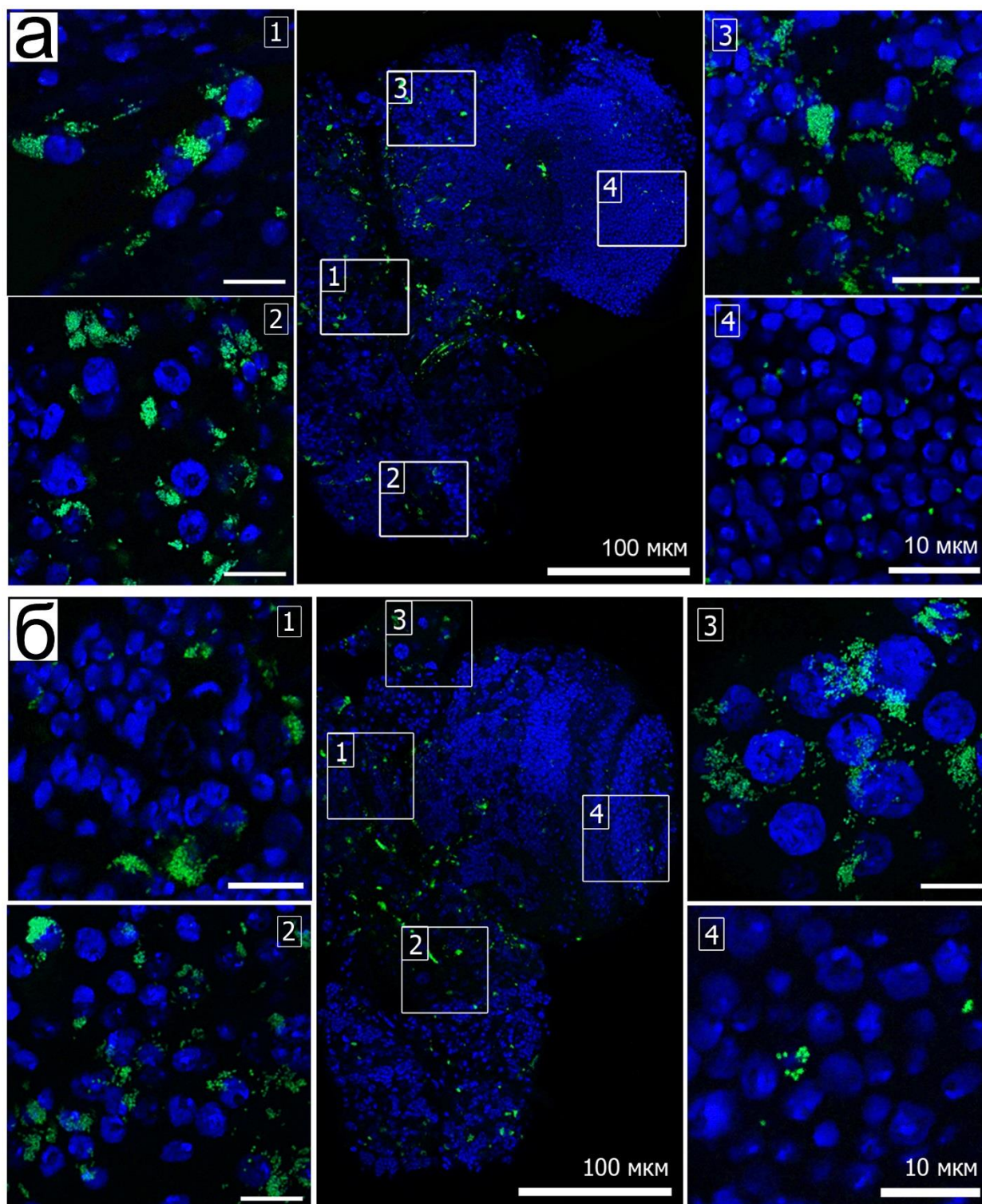


Рис. 34. Распределение *Wolbachia* в центральной нервной системе личинок 3-го возраста при 25 °C (а) и 29 °C (б) на 5-ый день развития. Зелёный цвет – *Wolbachia*, окрашенные с помощью пробы EUB338; синий цвет – ядра, окрашенные DAPI. Повышенная температура не влияет на плотность и распределение *Wolbachia* в ЦНС личинок на 5-ый день развития. 1 – подглоточный ганглий; 2 – центр сегмента брюшного нервного ствола; 3 – мозг личинки; 4 – зачаток оптической доли.

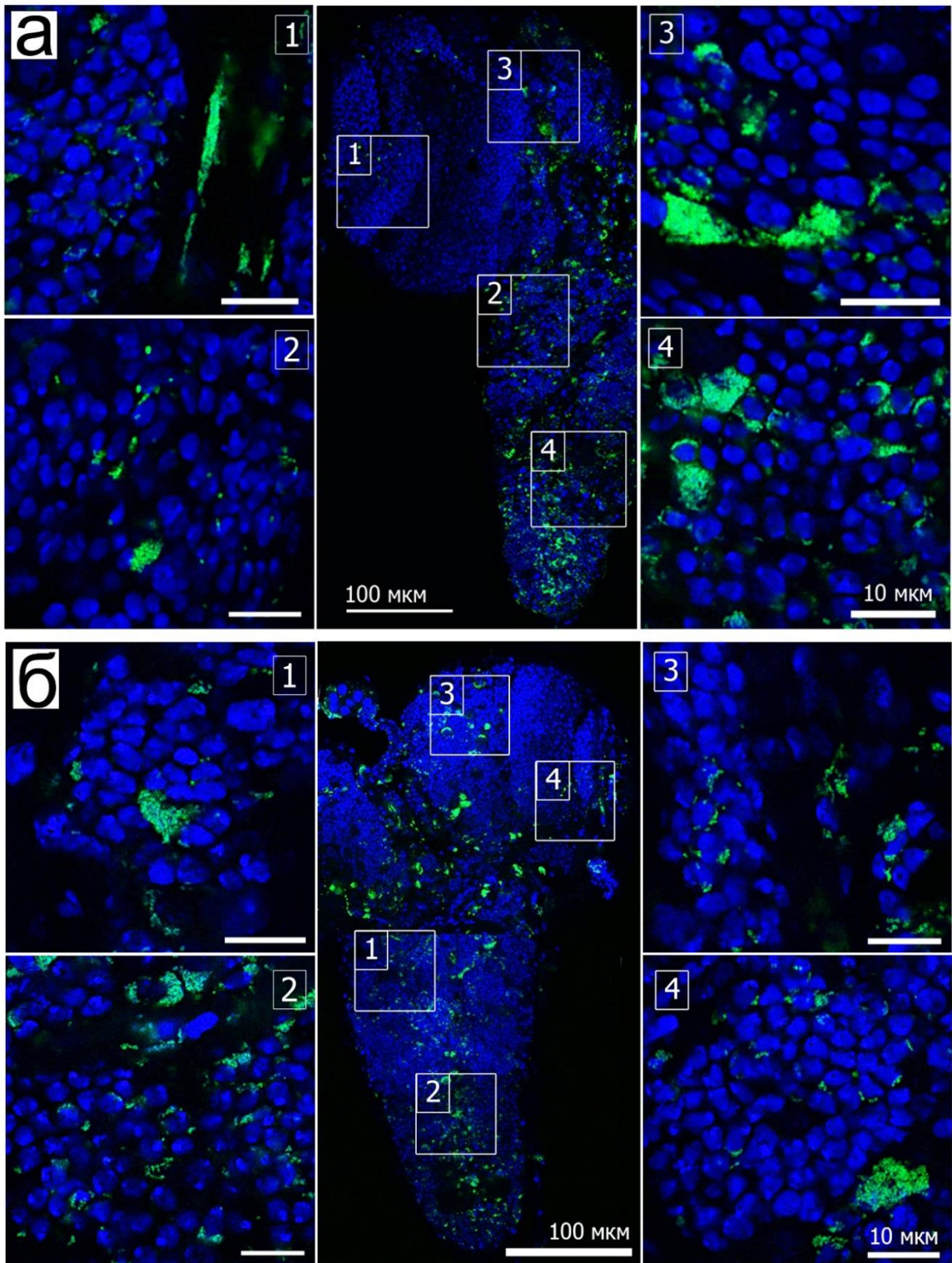


Рис. 35. Распределение *Wolbachia* в центральной нервной системе личинок 3-го возраста при 25 °С (а) и 29 °С (б) на 7-ой день развития. Зелёный цвет – *Wolbachia*, окрашенные с помощью пробы EUB338; синий цвет – ядра, окрашенные DAPI. Повышенная температура не влияет на плотность и распределение *Wolbachia* в ЦНС личинок на 7-ой день развития. 1 – подглоточный ганглий; 2 – центр сегмента БНС; 3 – мозг личинки; 4 – зачаток оптической доли.

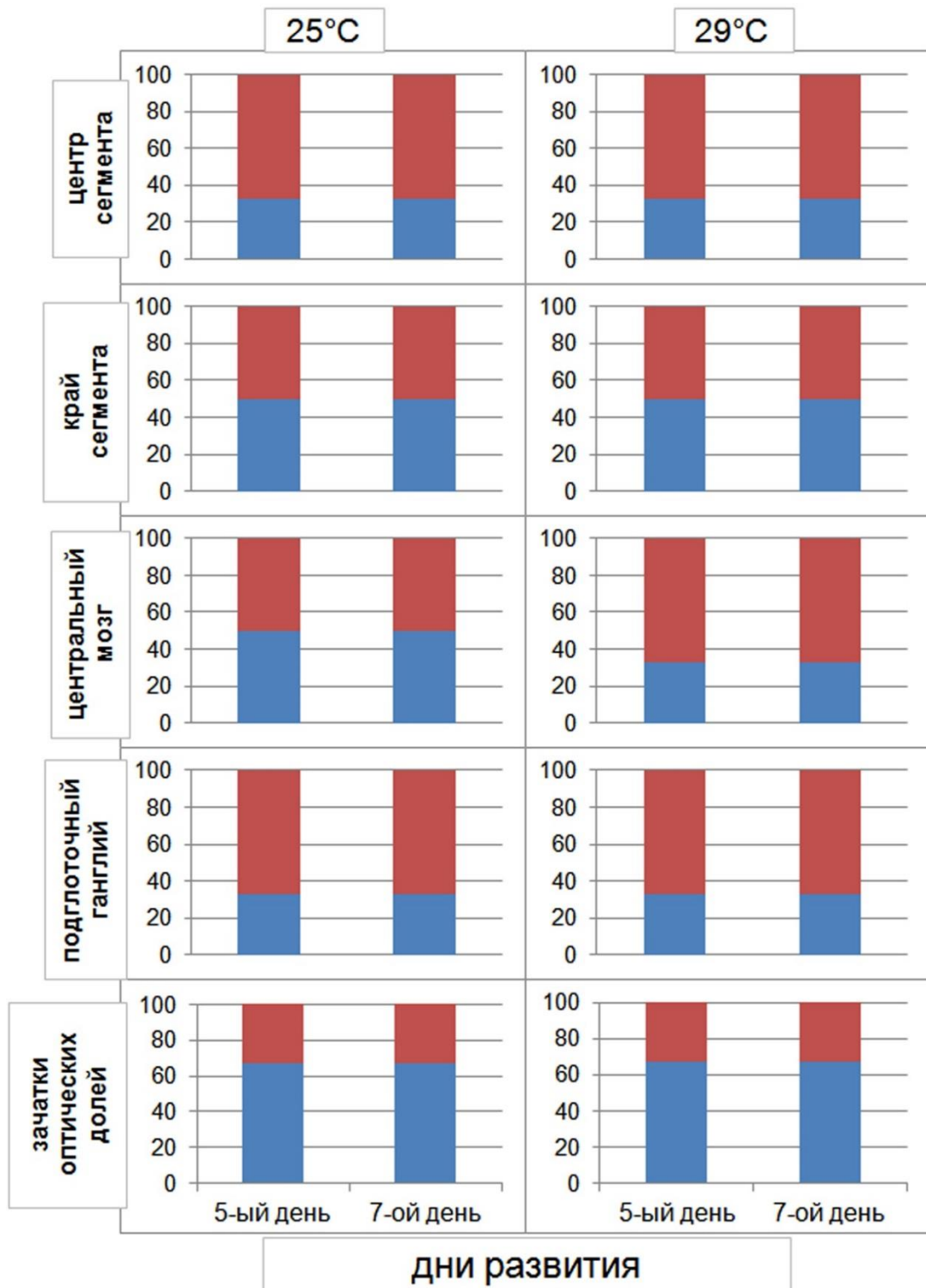


Рис. 36. Гистограмма, демонстрирующая процентное соотношение групп клеток с определёнными титрами бактерий в различных областях ЦНС личинки 3-го поколения *D. melanogaster* на 5-ый и 7-ой дни развития, содержащихся при 25 °С и 29 °С. Синим цветом обозначена первая группа (1–10 бактерий на клетку); красным цветом – вторая группа (10–200 бактерий на клетку). Увеличение плотности бактерий отмечается только в центральном мозге при 29 °С.



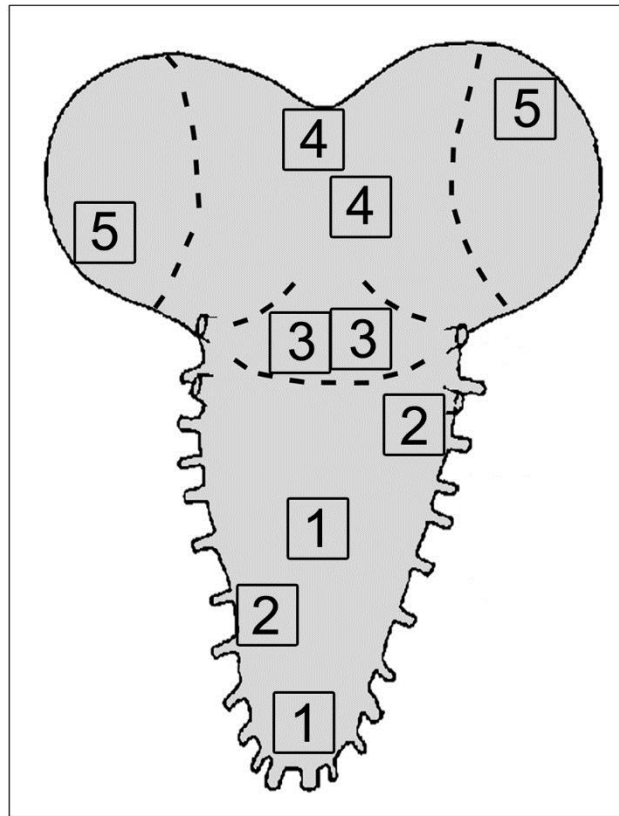


Рис. 37. Области ЦНС личинки 3-го поколения, которые были взяты для анализа динамики различающихся по плотности бактерий клеток. Размер каждого квадрата равен  $160 \text{ мкм}^2$ . 1 – центр сегмента БНС; 2 – край сегмента БНС; 3 – подглоточный ганглий; 4 – центральный мозг; 5 – зачаток оптической доли.

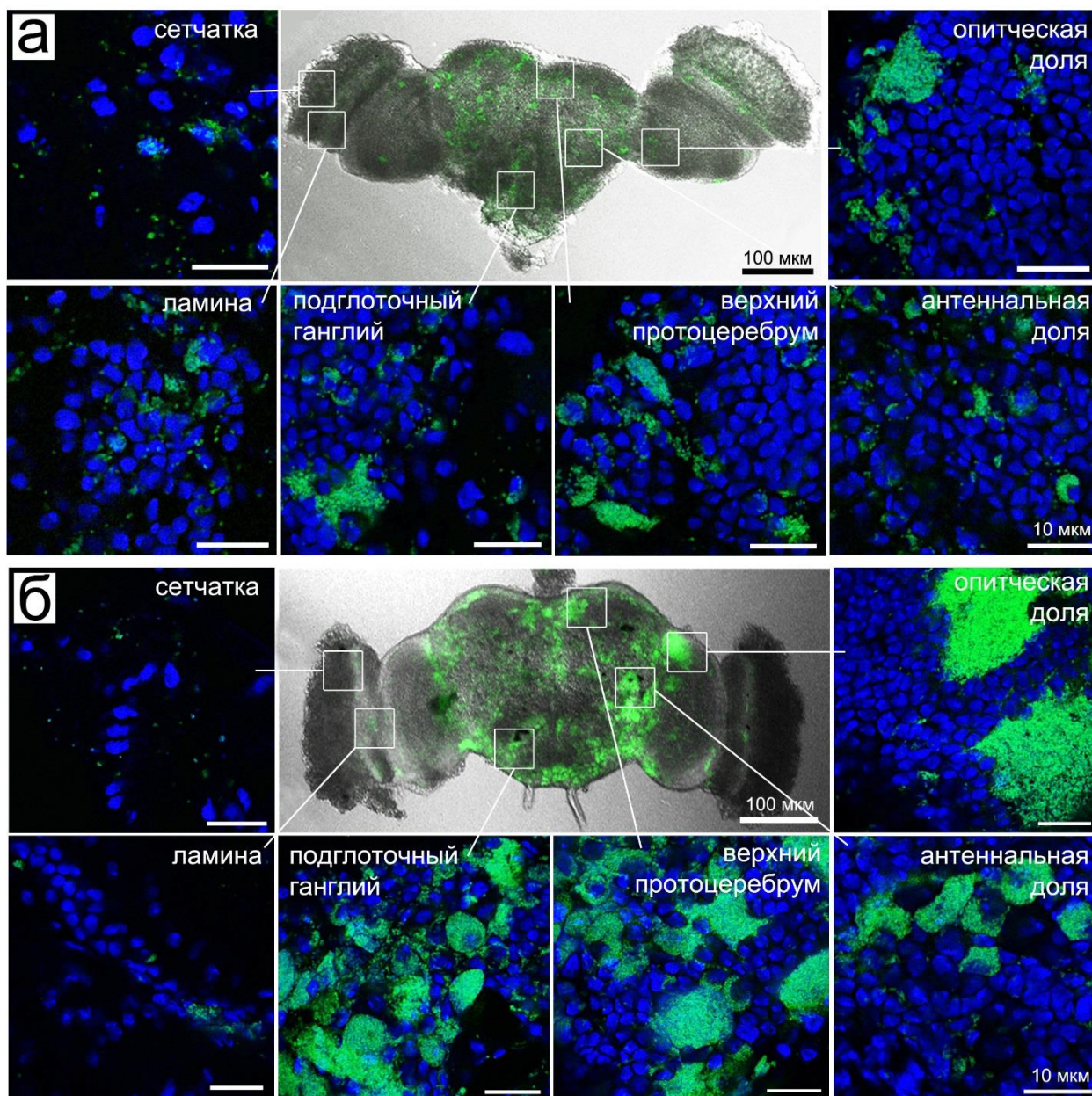


Рис. 38. Распределение *Wolbachia* в мозге взрослых *D. melanogaster* при 25 °C (а) и 29 °C (б) на 1-ый день после вылета имаго. Зелёный цвет – *Wolbachia*, окрашенные с помощью пробы EUB338; синий цвет – ядра, окрашенные DAPI. Повышенная температура приводит к существенному увеличению количества бактерий во всех областях мозга кроме ламины и сетчатки.

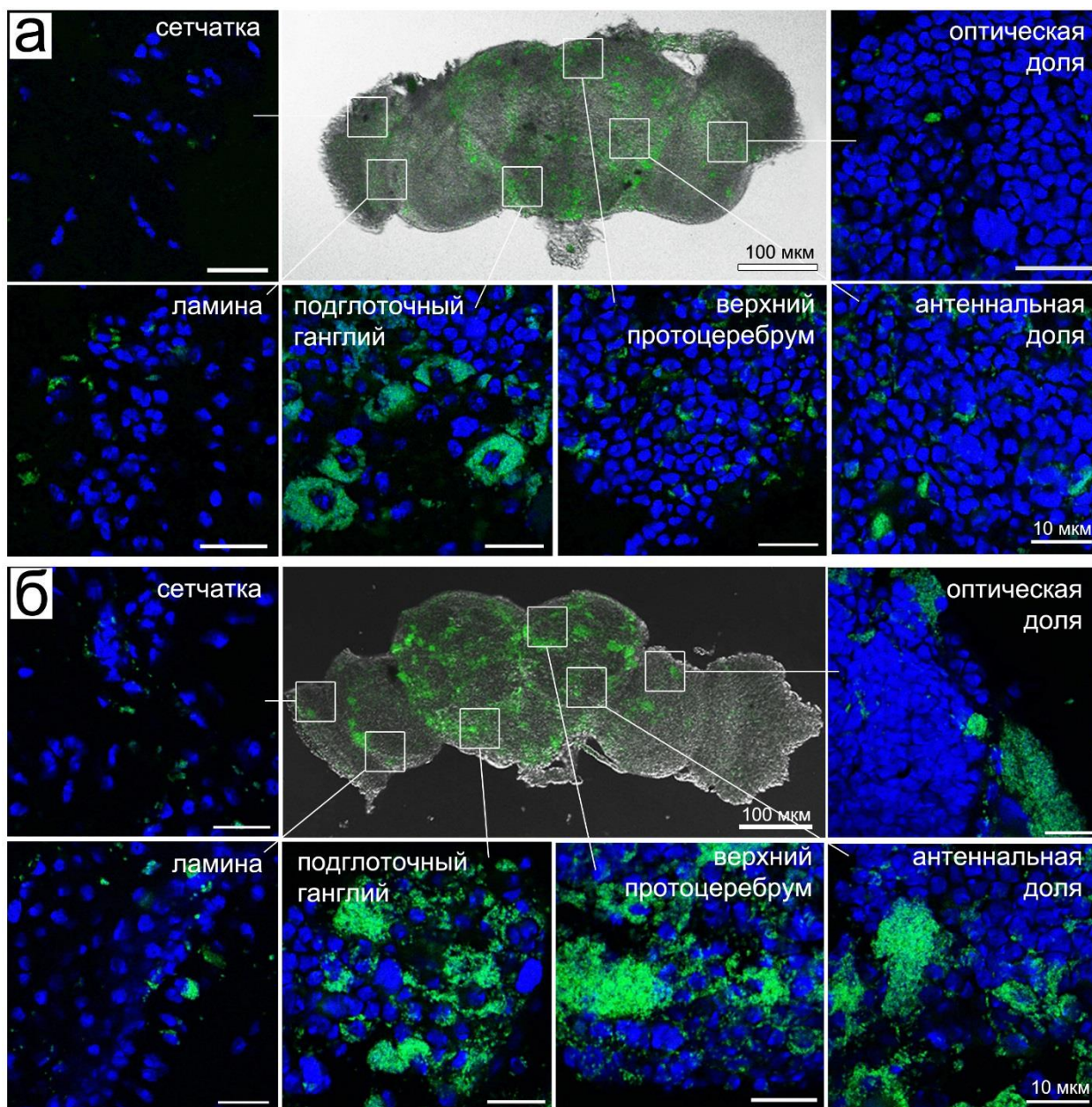


Рис. 39. Распределение *Wolbachia* в мозге взрослых *D. melanogaster* при 25 °C (а) и 29 °C (б) на 3-ий день после вылета имаго. Зелёный цвет – *Wolbachia*, окрашенные с помощью пробы EUB338; синий цвет – ядра, окрашенные DAPI. Повышенная температура приводит к существенному увеличению количества бактерий во всех областях мозга кроме ламины и сетчатки.

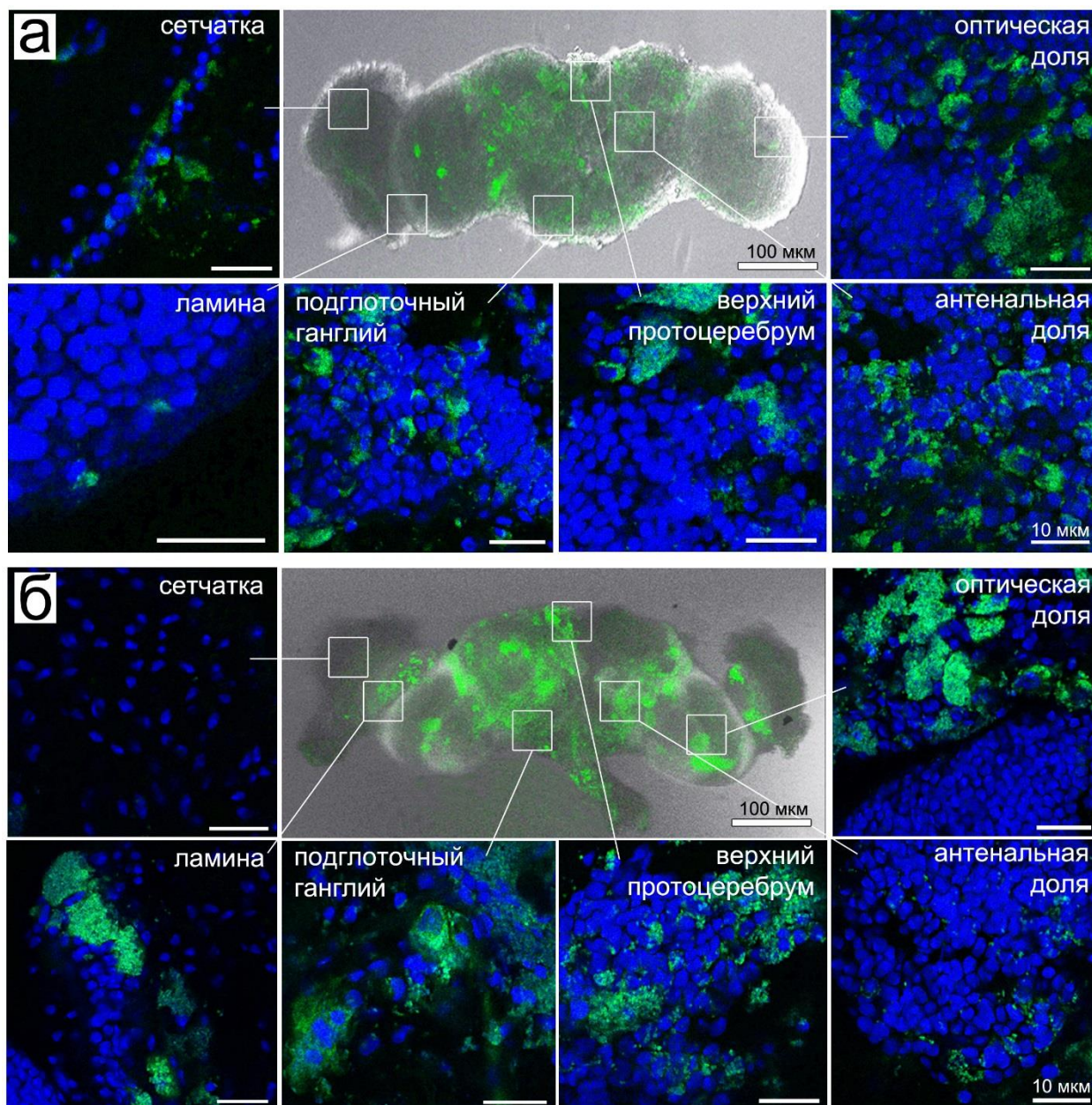


Рис. 40. Распределение *Wolbachia* в мозге взрослых *D. melanogaster* при 25 °C (а) и 29 °C (б) на 7-ой день после вылета имаго. Зелёный цвет – *Wolbachia*, окрашенные с помощью пробы EUB338; синий цвет – ядра, окрашенные DAPI. Повышенная температура приводит к существенному увеличению количества бактерий во всех областях мозга кроме ламины и сетчатки.

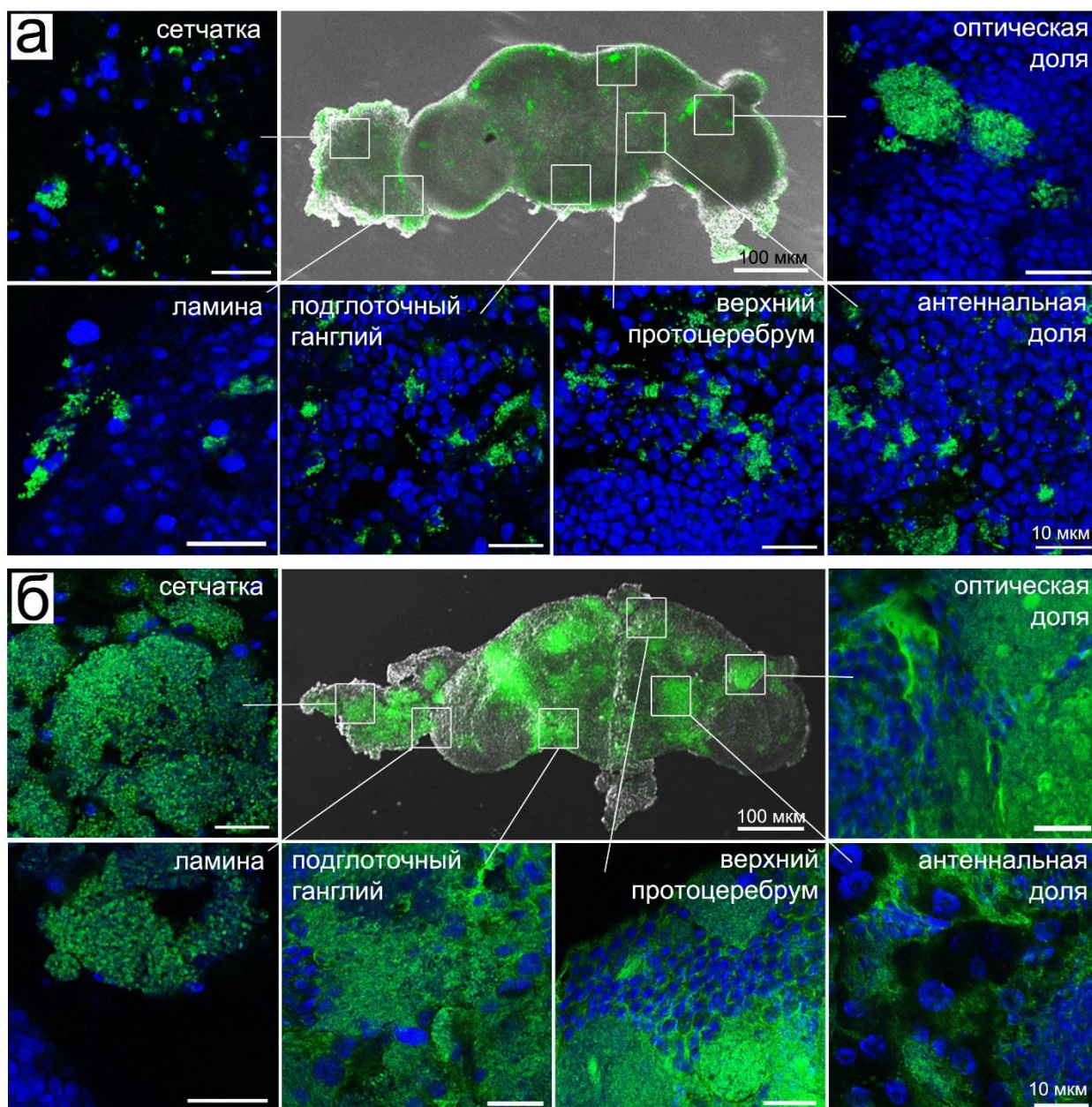


Рис. 41. Распределение *Wolbachia* в мозге взрослых *D. melanogaster* при 25 °C (а) и 29 °C (б) на 13-ый день после вылета имаго. Зелёный цвет – *Wolbachia*, окрашенные с помощью пробы EUB338; синий цвет – ядра, окрашенные DAPI. Повышенная температура приводит к существенному увеличению количества бактерий во всех областях мозга, иногда включая ламину и сетчатку. Практически все области ткани мозга содержат клетки третьей группы (200-10000 бактерий на клетку).

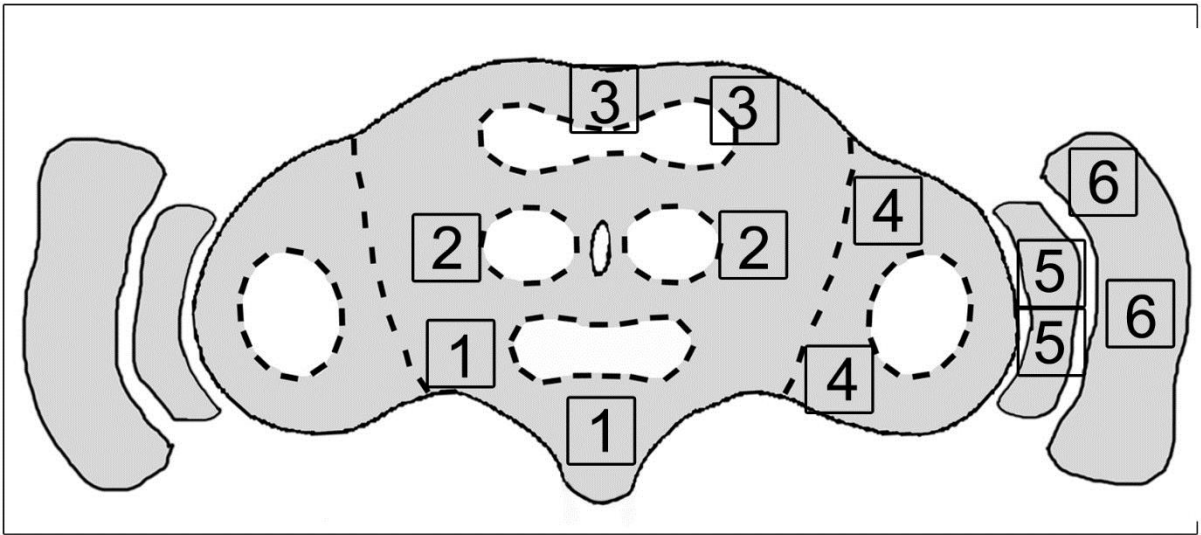


Рис. 42. Области мозга взрослой мухи, которые были взяты для анализа динамики групп титров *Wolbachia*. Размер каждого квадрата равен  $160 \text{ мкм}^2$ . 1 – подглоточный ганглий; 2 – антеннальные доли; 3 – верхний протоцеребрум; 4 – оптическая доля; 5 – ламина; 6 – сетчатка.

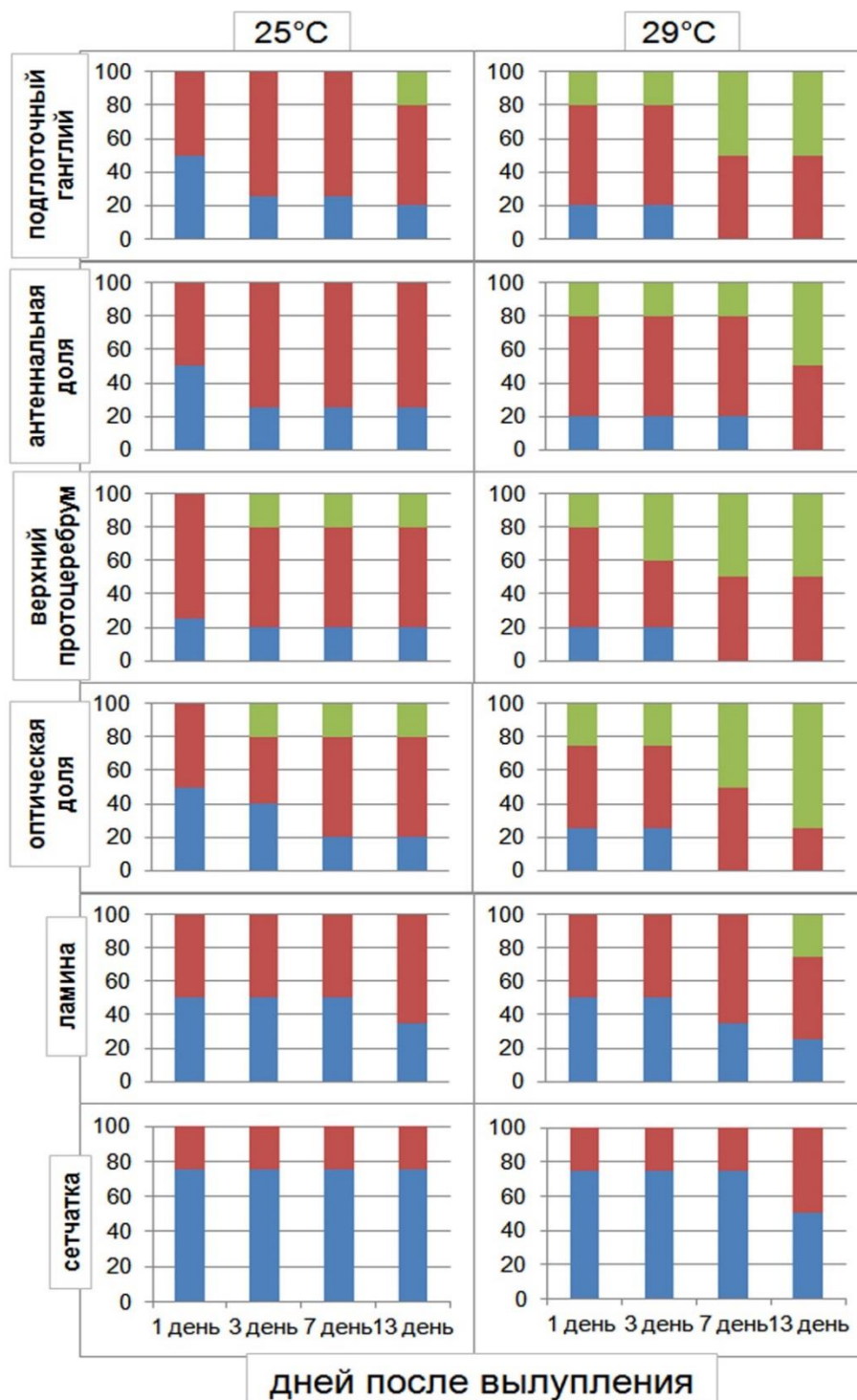


Рис. 43. Гистограмма, демонстрирующая процентное соотношение групп клеток с определёнными тирами бактерий в различных областях мозга *D. melanogaster* на 1-ый, 3-ий, 7-ой и 13-ый дни после вылета имаго, содержащихся при 25 °С и 29 °С. Синим цветом обозначена первая группа (1–10 бактерий на клетку); красным цветом – вторая группа (10–200 бактерий на клетку); зелёным цветом – третья группа (200–10000 бактерий на клетку). При 29 °С заметна корреляция между увеличением количества клеток третьей группы и возраста мух.

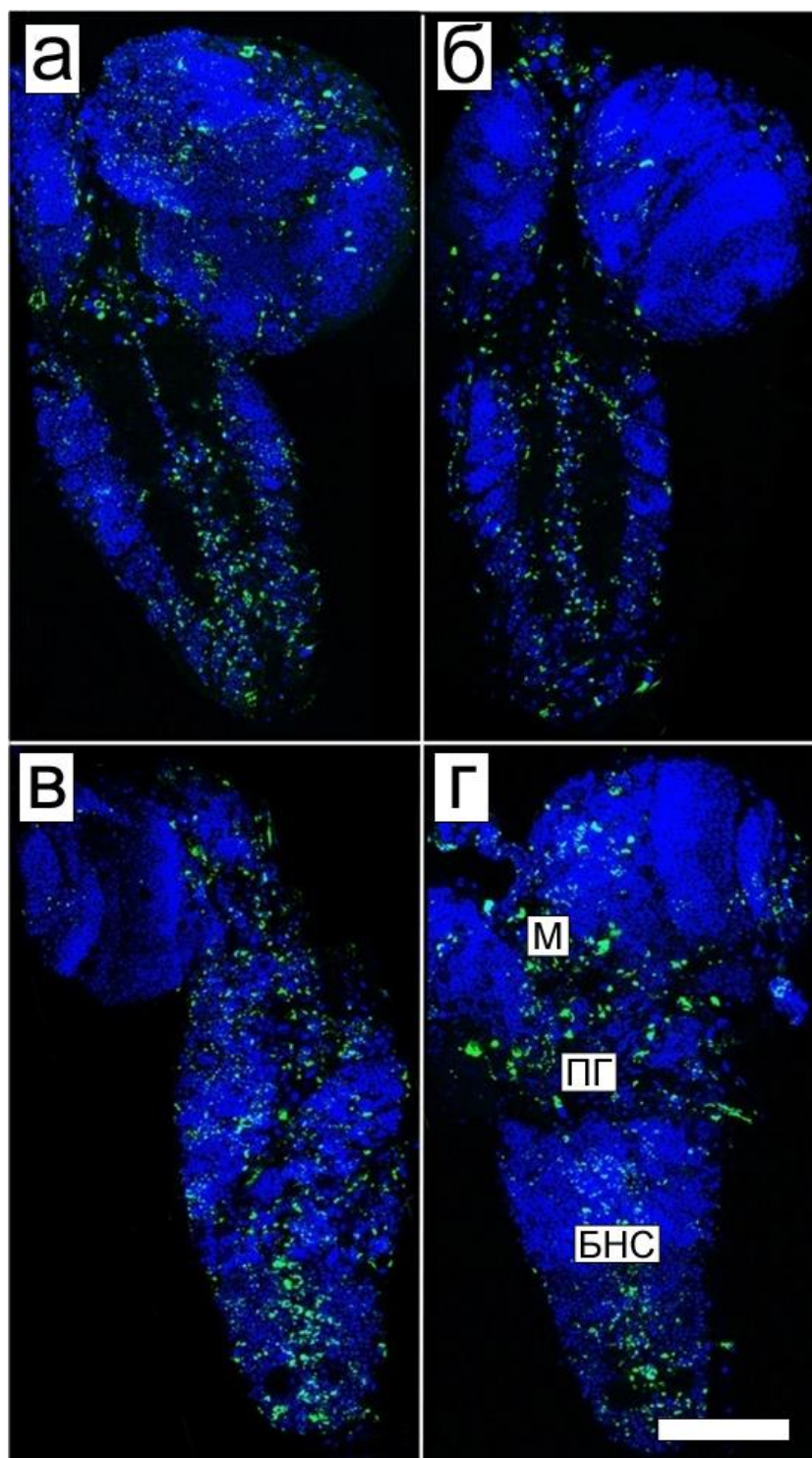


Рис. 44. Флуоресцентная гибридизация *in situ* ЦНС личинки третьего возраста *D. melanogaster* с использованием универсальной бактериальной пробы EUB338 (зелёный). а, в – соответственно, 5ый и 7ой дни развития (личинка третьего поколения) при 25 °С. б, г - 5ый и 7ой, соответственно, день развития (личинка третьего поколения) при 29 °С. *Wolbachia* локализуется в основном в брюшном нервном стволе (БНС), подглоточном ганглии (ПГ) и центральном мозге (М). Синий – ядра, окрашенные DAPI. Масштаб: 100 мкм.



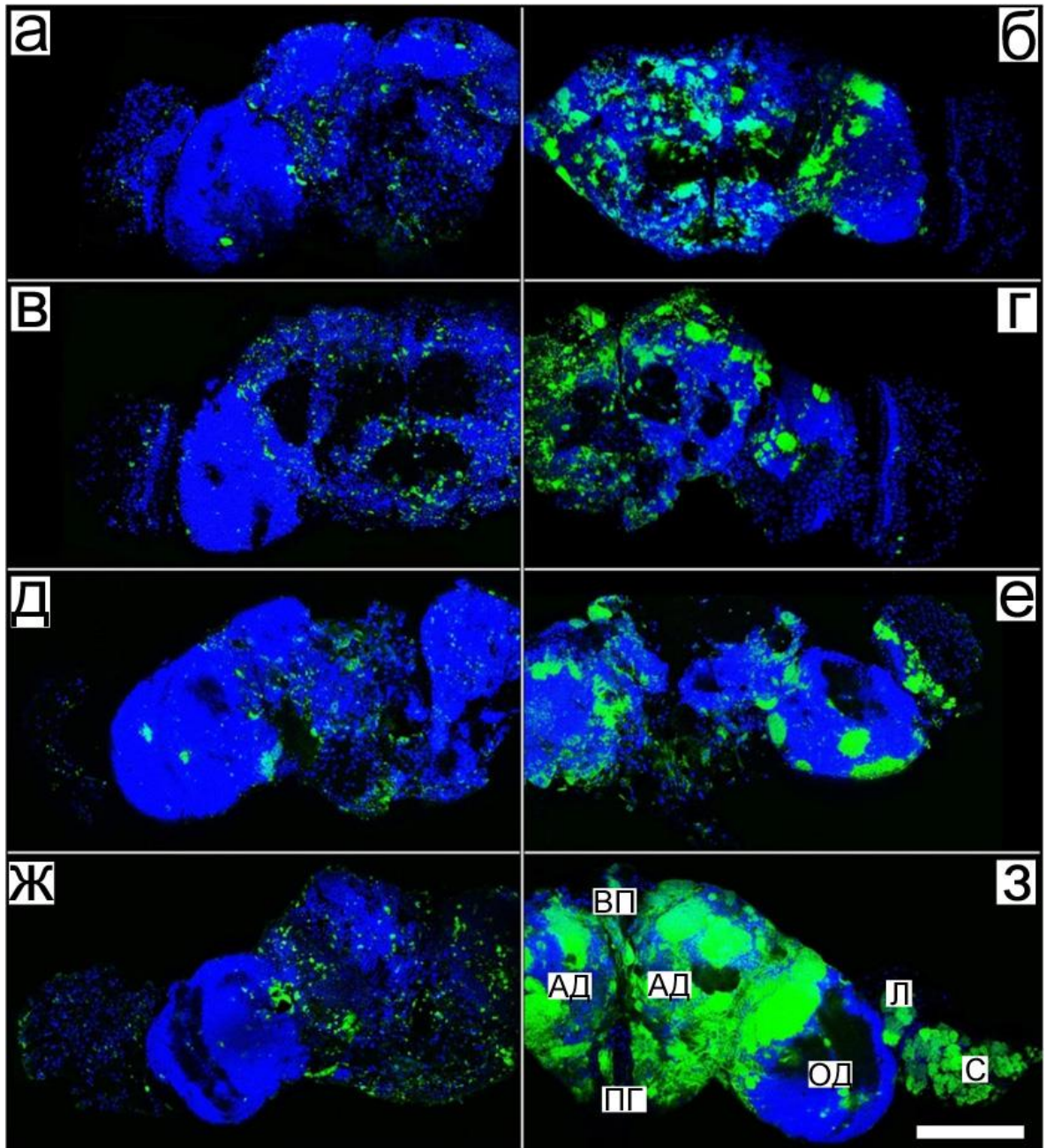


Рис. 45. Флуоресцентная гибридизация *in situ* мозга взрослых *D. melanogaster* с использованием бактериоспецифичной пробы EUB338 (зелёный), демонстрирующая различия в количестве бактерий в клетках после разных периодов температурного воздействия. а, в, д, ж – 1-ый, 3-ий, 7-ой и 13-ый дни, соответственно, содержания при 25 °С после вылета имаго. б, г, е, з – 1-ый, 3-ий, 7-ой и 13-ый дни, соответственно, содержания при 29 °С после вылета имаго. *Wolbachia* локализуются в основном в подглоточном ганглии (ПП) и центральном отделе (ВП, АД). Также бактерии обнаруживаются в оптических долях (ОД) и иногда в ламине (Л) и сетчатке (С). Синий – ядра, окрашенные DAPI Масштаб: 100 мкм.

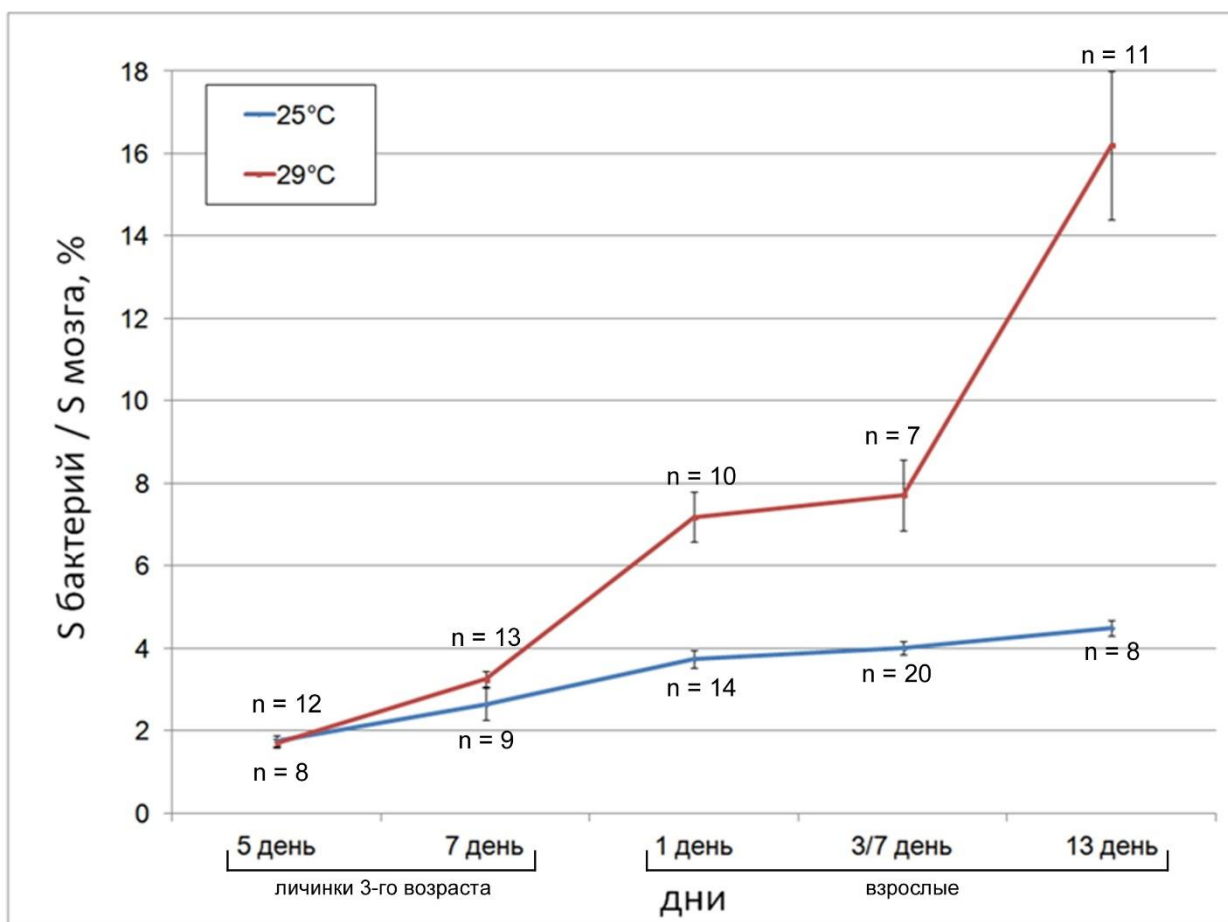


Рис. 46. График, демонстрирующий динамику титра *Wolbachia* в клетках мозга *D. melanogaster* с 5 дня развития (личинка третьего возраста) по 13 день после вылета имаго при 25 °C (синий) и 29 °C (красный). В периоды с 7-го дня развития личинки по 1-ый день после вылета имаго и с 7-го дня по 13-ый день после вылета имаго происходит существенное увеличение количества бактерий. n – количество проанализированных срезов. Планки погрешностей демонстрируют стандартную ошибку.

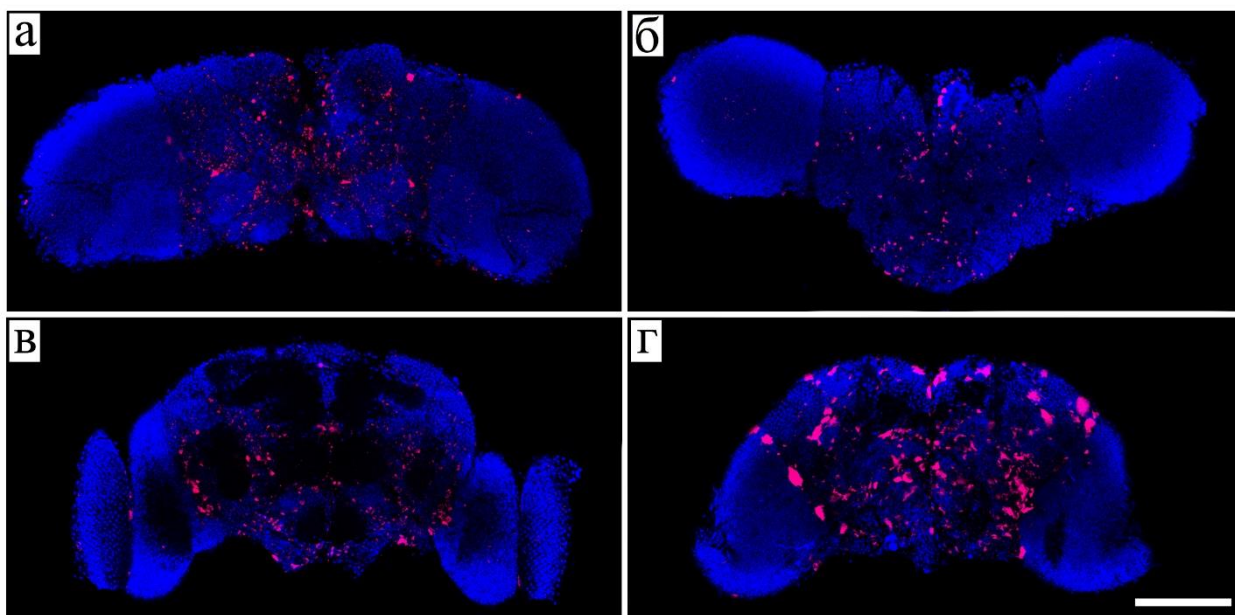


Рис. 47. Флуоресцентная гибридизация *in situ* мозга куколок *D. melanogaster* с использованием *Wolbachia* специфичной пробы W2 (розовый). а, в – «средняя» и «поздняя» куколка при 25 °С, соответственно. б, г – «средняя» и «поздняя» куколка при 29 °С, соответственно. *Wolbachia* локализуются в основном в центральном отделе. На стадии «поздней» куколки при 29 °С (г) заметно увеличение плотности бактерий. Синий – ядра, окрашенные DAPI Масштаб: 100 мкм.

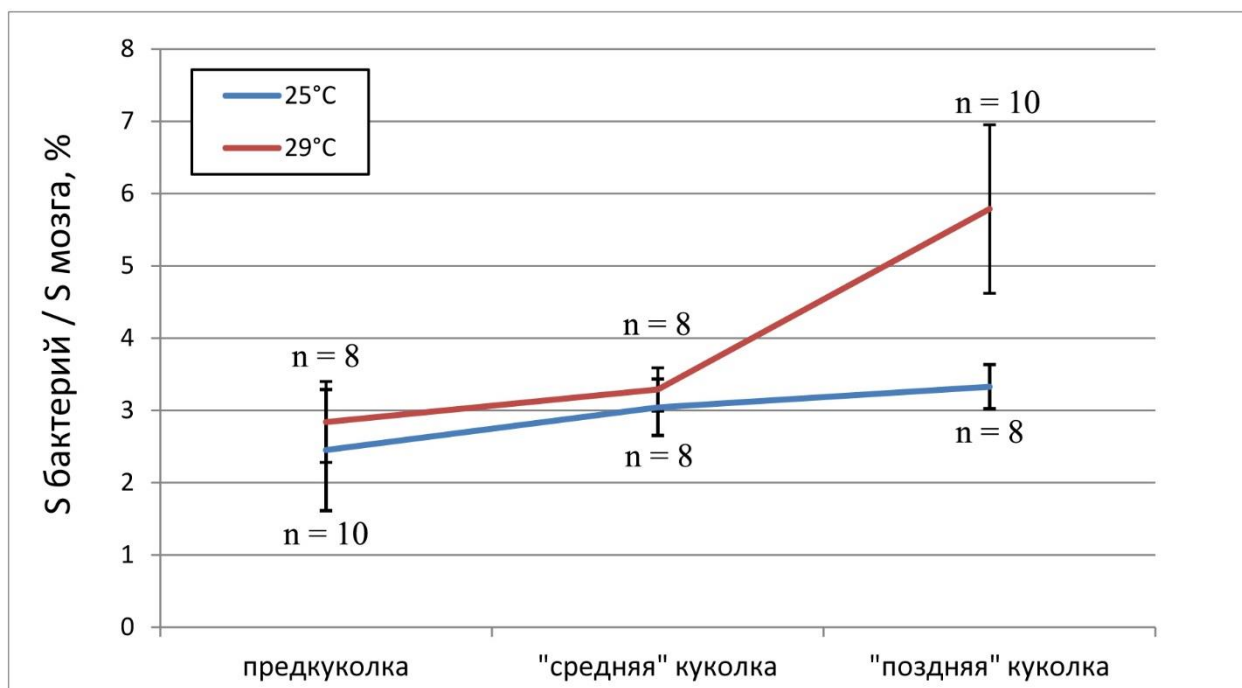


Рис. 48. График, демонстрирующий динамику титра *Wolbachia* в клетках мозга *D. melanogaster* во время метаморфоза при 25 °С (синий) и 29 °С (красный). На стадии «поздней» куколки происходит существенное увеличение количества бактерий. n – количество проанализированных срезов. Планки погрешностей демонстрируют стандартную ошибку.

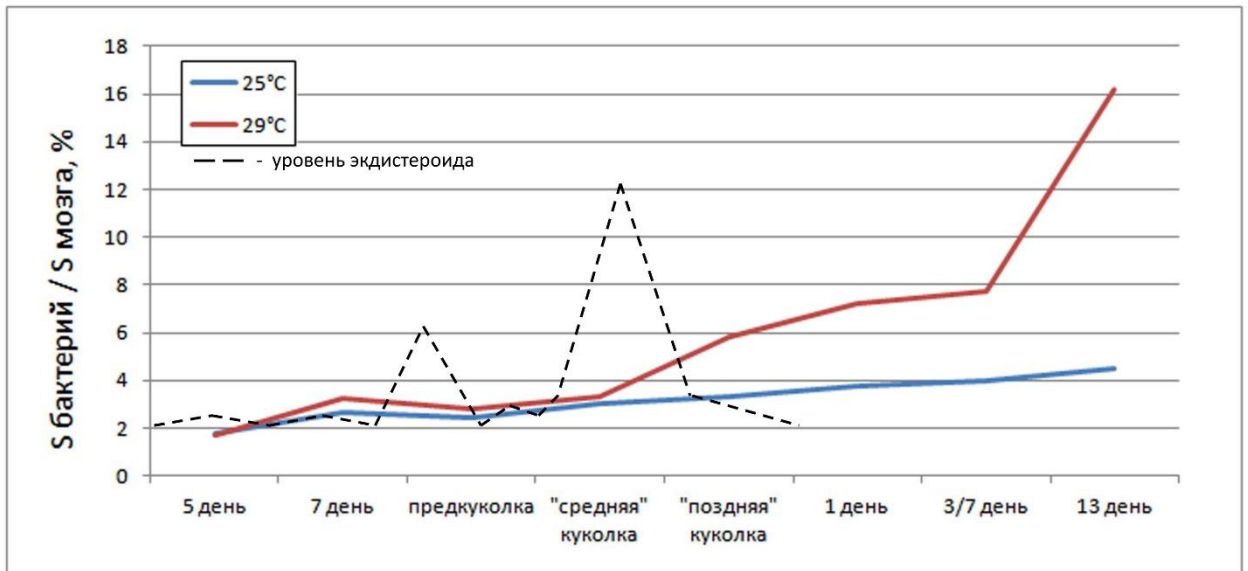


Рис. 49. График, демонстрирующий динамику титра *Wolbachia* в клетках мозга *D. melanogaster* на стадии личинки 3-го возраста (5-ый и 7-ой день развития), куколки («предкуколка», «средняя» куколка, «поздняя» куколка) и взрослой мухи (1-ый, 3/7-ой и 13-ый день после вылета имаго) при 25 °C (синий) и 29 °C (красный) с наложением динамики уровня экдистероида (по L.M. Riddiford, 1993) на протяжении перечисленных периодов. На стадии «поздней» куколки, после пика экдистероида, происходит существенное увеличение количества бактерий. Планки погрешностей демонстрируют стандартную ошибку.

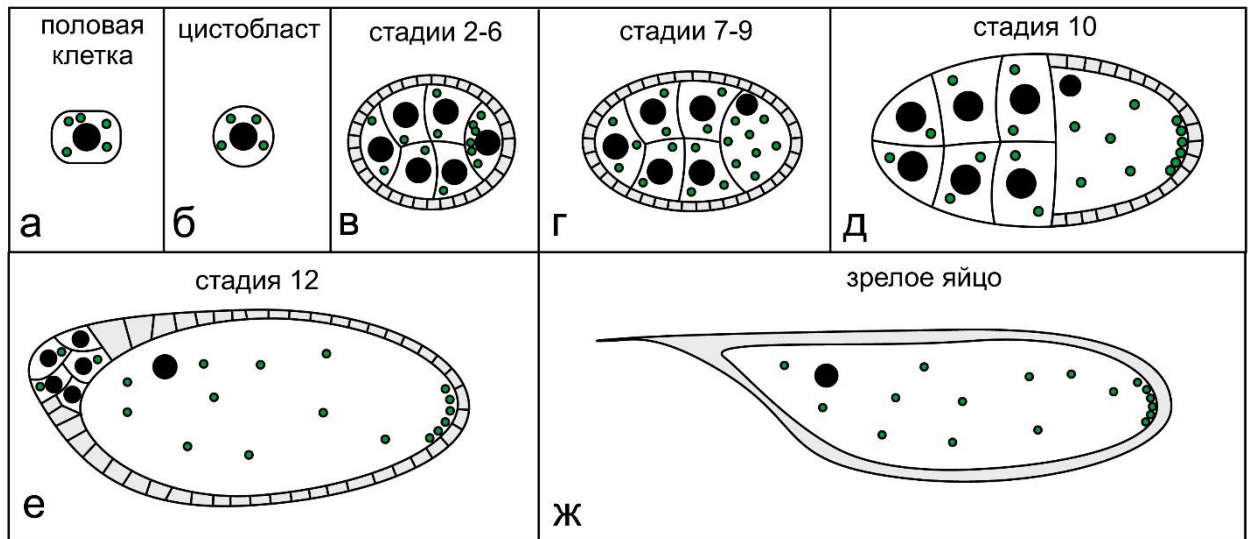


Рис. 50. Схема локализации *Wolbachia* на разных стадиях оогенеза *D. melanogaster*. а, б – равномерное распределение бактерий на стадии, соответственно, половой клетки и формирующегося из неё цистобласта, соответственно; в – распределение *Wolbachia* на 2-6 стадиях оогенеза; наибольшее количество бактерий сосредотачивается в будущем ооците; г – локализация *Wolbachia* на 7-9 стадиях; бактерии равномерно распределены по всем клеткам; д – ж – локализация *Wolbachia* на стадиях 10, 12 и зрелого яйца; часть бактерий перемещается к полюсу, где в будущем формируются предшественники половых клеток. Бактерии обозначены зелёными точками. Модифицировано из Serbus *et al.*, 2008.

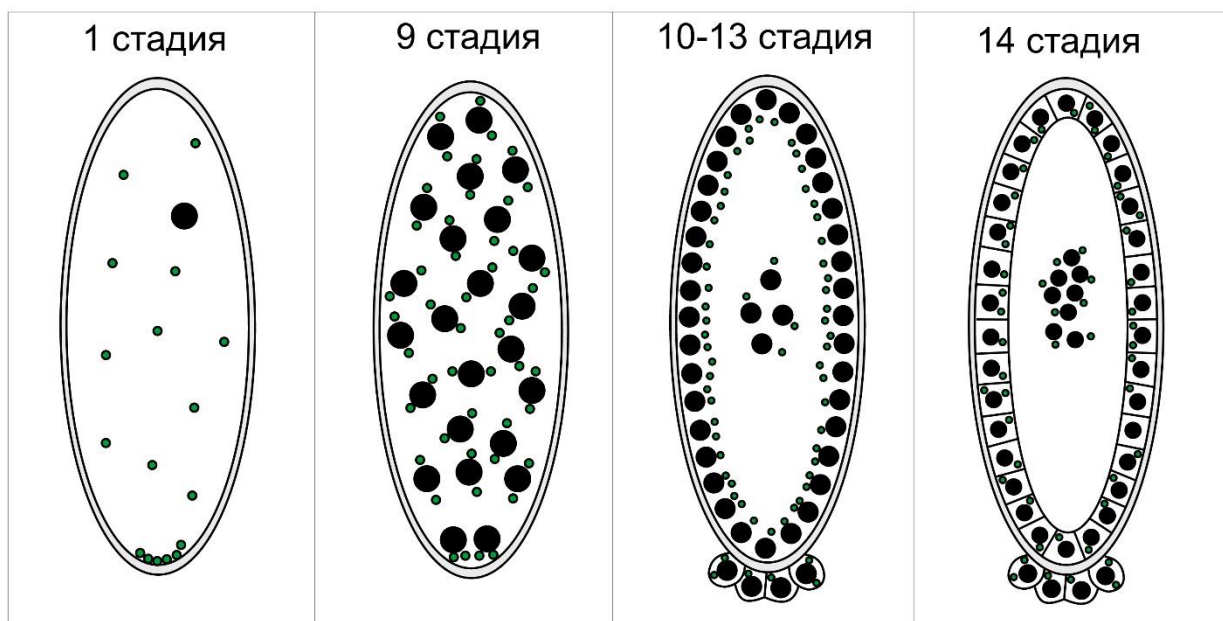


Рис. 51. Схема локализации *Wolbachia* на разных стадиях раннего эмбриогенеза *D. melanogaster*. С 1-ой по 13-ю стадию происходит равномерное распределение бактерий между делящимися ядрами на периферии эмбриона. Часть бактерий перемещается в область формирующихся отдельный слой полярных клеток (стадия 10-13). На 14-ой стадии происходит целюляризация, при которой формируются клетки, содержащие равное количество *Wolbachia* в цитоплазме.

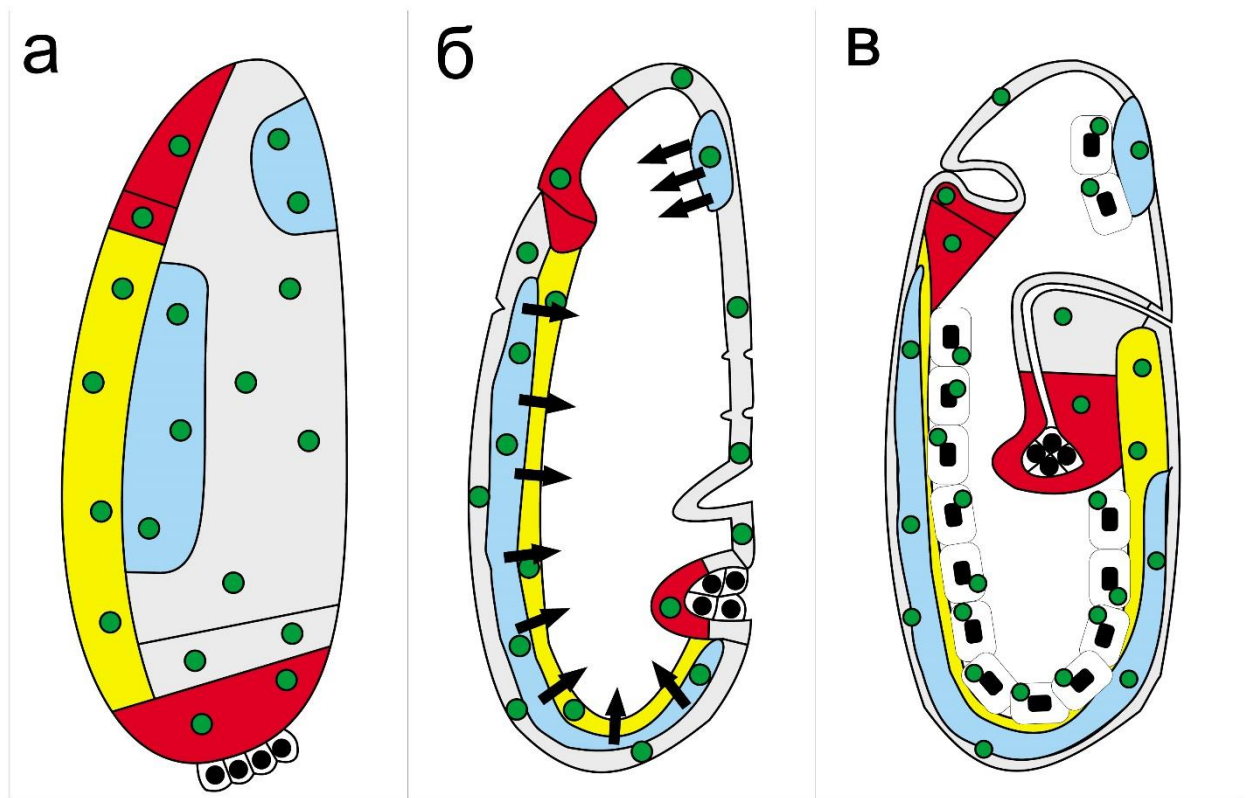


Рис. 52. Локализация *Wolbachia* на разных стадиях гастрюляции *D. melanogaster*. Серым цветом обозначается эктодерма, голубым цветом выделены нейрогенные области эктодермы, из которых формируется центральная нервная система (ЦНС) эмбриона, жёлтым обозначается мезодерма, а красным – энтодерма. Зелёными точками выделены бактерии *Wolbachia*. а – бактерии распределены равномерно по всем трём будущим зародышевым листкам. б – формирование зародышевых листков в результате инвагинаций; *Wolbachia* равномерно распределены во всех трёх зародышевых листках; стрелками обозначено направление будущего отслоения нейробластов из нейрогенной области эктодермы (голубой); предшественники половых клеток (внизу справа) начинают углубляться; в – отслоившиеся нейробласты, равномерно инфицированные бактериями, формируют ЦНС эмбриона. Предшественники половых клеток, также содержащие *Wolbachia* в цитоплазме, полностью инвагинируют. Изображение трёх стадий гастрюляции модифицировано из Leptin, 1999.



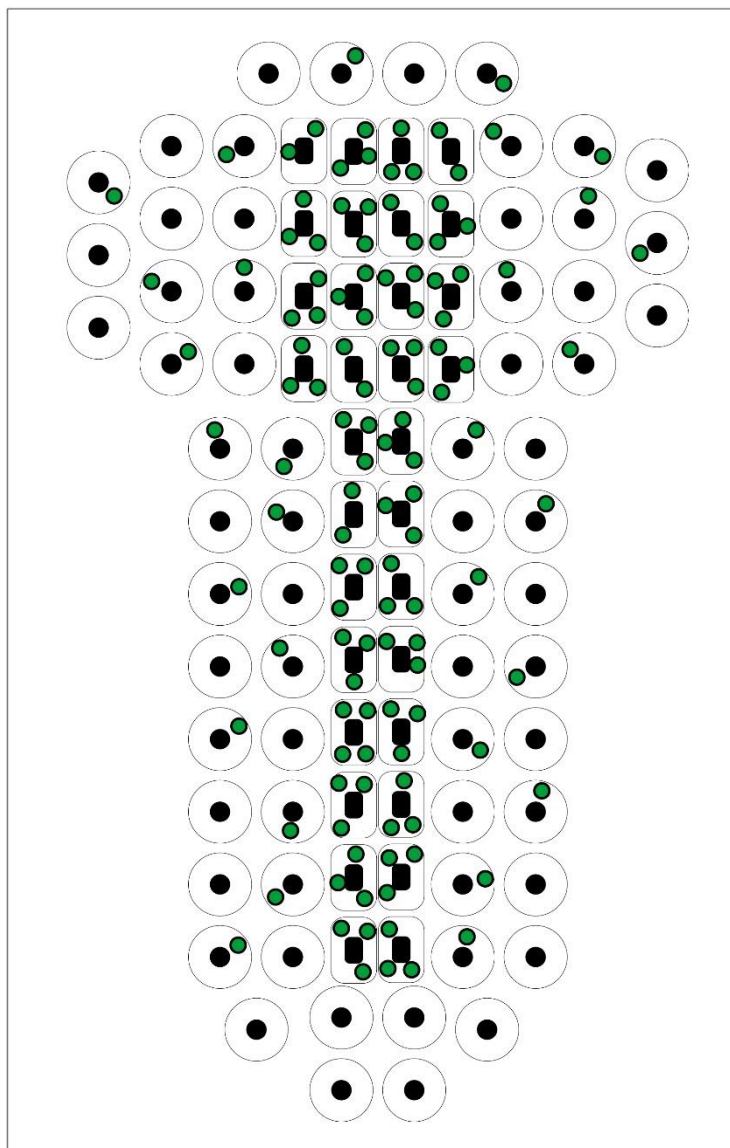


Рис. 53. Схема формирования центральной нервной системы эмбриона *D. melanogaster*. На данном этапе происходит неравномерное распределение *Wolbachia* между делящимися клетками. Квадратными клетками обозначены нейробласты, равномерно инфицированные бактериями *Wolbachia*. Круглыми клетками обозначены первичные нейроны, формирующиеся из нейробластов. В некоторые первичные нейроны может попадать небольшое количество бактерий. Многие клетки свободны от бактерий. *Wolbachia* выделены зелёными кружками.

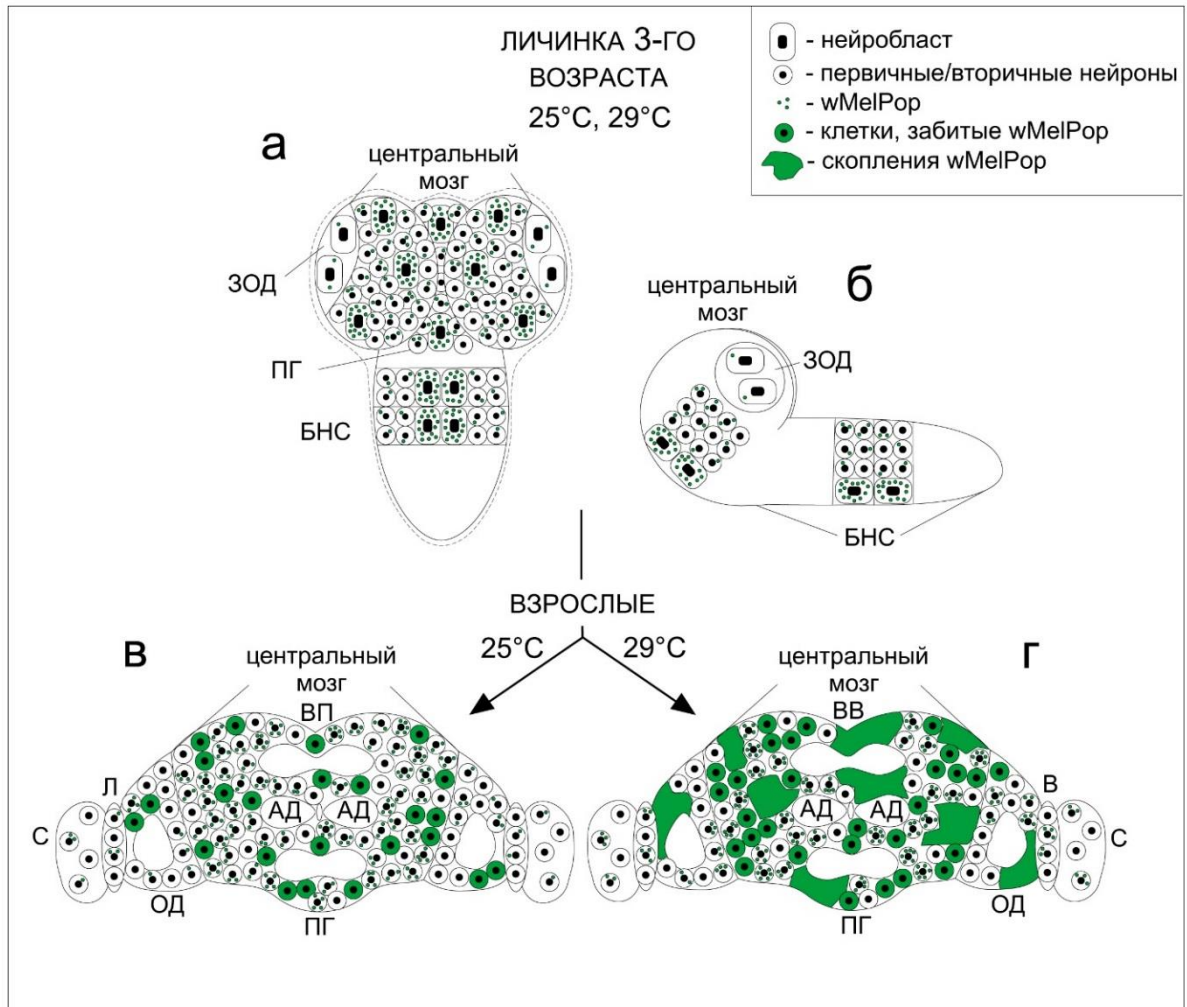


Рис. 54. Схема распределения бактерий *Wolbachia* в ЦНС личинок 3-го поколения (а, б) и мозге взрослых *D. melanogaster* (в, г) при 25 °С и 29 °С. а, б – соответственно, поперечный и саггитальный срезы ЦНС личинки 3-го поколения, соответственно, демонстрирующие неравномерное распределение бактерий между нейробластами и образующимися в результате их деления нейронами, образующимися в результате их деления, в брюшном нервном стволе (БНС), центральном мозге, подглоточном ганглии (ПГ) и зачатках оптических долей (ЗОД). Видны различия по плотности *Wolbachia* между клетками и присутствие клеток, свободных от бактерий. Повышенная температура (29 °С) не оказывает существенного влияния на размножение бактерий в ЦНС личинок 3-го поколения. (в, г) – фронтальные срезы взрослого мозга мухи, демонстрирующие различия в плотности *Wolbachia* в центральном мозге, подглоточном ганглии (ПГ), оптической доле (ОД), ламине (Л) и сетчатке (С) при 25 °С и 29 °С, соответственно. Повышенная температура значительно увеличивает титр бактерий в мозге взрослых мух.