

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

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск 2014

Работа выполнена в лаборатории морфологии и функции клеточных структур Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

Научные руководители: кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник
Киселева Елена Владимировна

Официальные оппоненты: **Омельянчук Леонид Владимирович**,
доктор биологических наук, профессор,
заведующий лабораторией генетики клеточного цикла, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирское отделение Российской академии наук, г. Новосибирск

Глулов Виктор Вячеславович,
доктор биологических наук, профессор,
директор, заведующий лабораторией патологии насекомых, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт систематики и экологии животных Сибирское отделение Российской академии наук, г. Новосибирск

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирское отделение Российской академии наук, г. Иркутск

Защита диссертации состоится «___» _____ 2014 г. на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.011.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук в ИЦиГ СО РАН в конференц-зале Института по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, д. 10, тел. (383) 363-49-06, факс (383) 333-12-78, e-mail: dissov@bionet.nsc.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института www.bionet.nsc.ru

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

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. В настоящее время актуальным является изучение воздействия кишечной микрофлоры на поведение хозяина и его приспособленность к окружающей среде (Heijtz *et al.*, 2011; Cryan, Dinan, 2012; Montiel-Castro *et al.*, 2013; Lyte, 2014). 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. Известно, что эффективность симбиоза зависит от генотипов организмов и условий их обитания (Thomas, Blanford, 2003). Хозяин и симбионт могут специфически реагировать на изменения окружающей среды, а реакция симбиотической ассоциации в целом зависит от тесного их взаимодействия 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 воздействовать 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 сельскохозяйственными вредителями сельского. Например, продемонстрировано успешное внедрение комаров *Aedes aegypti*, инфицированных *Wolbachia* штамма wMelPop, в природную популяцию этих переносчиков лихорадки Денге на территории Австралии, что привело к снижению частоты передачи вирусной инфекции людям (Hoffman *et al.*, 2011). Экспериментально была получена инфицированная *Wolbachia* стабильная линия комаров *Anopheles stephensi* - одного из главных видов-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).

Изучение влияния стрессовых условий среды на симбиотическую ассоциацию является важным и приоритетным направлением для разработки и планирования полевых экспериментов. Особенности распределения *Wolbachia* в разных отделах мозга насекомых в условиях стресса представляют важный фундаментальный аспект данного

направления, открывающего новые возможности для выявления механизмов действия бактерий на поведение хозяев.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы было исследование влияния *Wolbachia* штамма wMelPop на продолжительность жизни (ПЖ) и выживаемость *Drosophila 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. 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.

Положения, выносимые на защиту:

1. Существует критический период (7-13 дней) воздействия повышенной температуры, который приводит к накоплению агрегатов бактерий в ЦНС *Drosophila melanogaster* и преждевременной гибели мух.
2. Влияние повышенной температуры на титр *Wolbachia* в мозге *Drosophila* проявляется начиная со стадии поздней куколки.
3. Характер распределения бактерий в различных отделах мозга мух закладывается в раннем эмбриогенезе при формировании ЦНС насекомого.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на: 14-й Международной Пущинской школе-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века» (Пущино, 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 Пущинской школе-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века» (Пущино, 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).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 работ, из них 3 работы – статьи в отечественной и зарубежной печати, в журналах, входящих в список ВАК.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследования, обсуждения, выводов, библиографического списка и 1 приложения. Работа изложена на 186 листах машинописного текста, содержит 54 рисунка и 6 таблиц. Список литературы включает 196 источников.

Личный вклад автора. Основные результаты получены автором самостоятельно. Схема популяционного эксперимента по воздействию повышенной температуры на симбиотическую ассоциацию *Wolbachia-Drosophila* была разработана совместно с к.б.н. Ю.Ю. Илинским (ИЦиГ СО РАН). Часть флуоресцентных изображений распределения бактерий в мозге мух получены на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе с помощью к.б.н. С.И. Байбородина (ИЦиГ СО РАН). Основные результаты, представленные в публикациях, были получены автором.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Лабораторные линии мух

В данной работе использовали линию *Drosophila melanogaster w1118*, предоставленную 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.

Молекулярные методы

Проверку инфицированного и неинфицированного статуса линий проводили с помощью ПЦР, с использованием ДНК, выделенной из яиц мух и праймеров к фрагменту гена поверхностного белка *Wolbachia wsp 81F/wsp 691R* (Braig *et al.*, 1998). Электрофорез ДНК осуществляли в 1 % агарозном геле. Определение нуклеотидной последовательности фрагмента ДНК бактерий проводили с помощью набора для секвенирования BigDye 3.1 terminator и праймеров *wsp 81F/wsp 691R* в центре коллективного пользования автоматического секвенирования ДНК, ИЦиГ СО РАН.

Эксперименты по выживаемости мух при воздействии стрессовых температур

Первый эксперимент по выживаемости инфицированных и неинфицированных самок проводили при температурных режимах двух типов, условно обозначенных I и II. 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 °С), а затем переносили на 16 °С. Учёт выживаемости после переноса мух на 16 °С проводили каждые 5 дней до полной гибели мух. В качестве контроля к режиму II использовали *D. melanogaster*, постоянно содержащихся при 16 °С.

Во втором эксперименте аналогичные инфицированная и неинфицированная линии *D. melanogaster* содержались в инкубаторах при 25 °С и 29 °С. Мухи в течение 24 ч. откладывали яйца в 12 пробирках со стандартным кормом при 25 °С, после чего удалялись из пробирок. Половину пробирок с отложенными яйцами переносили на 29 °С, в то время как остальную часть оставляли при 25 °С. Личинок 3-го возраста собирали на 5-й и 7-й дни развития при 25 °С и 29 °С. В метаморфозе были исследованы следующие стадии: «предкуколка» (личинка 3-го возраста закрепляющаяся на стенке пробирки и начинающая формировать пупарий), «средняя» куколка (жёлто-коричневый пупарий, 35-45 часов после окукливания при 25 °С, 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 °С, стадии P12 и P13). Вылетающих имаго переносили в новые пробирки с кормом на 9-й день развития при 29 °С и на 11-й день при 25 °С. Мозг взрослых мух для флуоресцентной гибридизации *in situ* выделяли на 1-й, 3-й, 7-й и 13-й дни после их вылета при обеих температурах.

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

Электронная микроскопия

Фиксацию образцов мозга *D. melanogaster* для электронно-микроскопического анализа проводили согласно ранее описанному методу (Terasaki *et al.*, 2001; Жукова и

др., 2008). Затем образцы обезвоживали в спирте, ацетоне и заключали в смолу Agar 100 Resin. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу и исследовали в электронном микроскопе JEM 100 SX (JEOL, Япония).

Конфокальная микроскопия

Образцы мозга личинки 3-го возраста, куколок и взрослой мухи выделяли в 0,1 М фосфатном буфере и 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 °С в заранее подогретом и специфичном для флуоресцентной пробы буфере. В данной работе использовались две пробы: EUB338 (5'-Cy3-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'), которая связывается с участком 16S рНК, являющимся уникальным для большинства известных грамотрицательных бактерий (Amann *et al.*, 1990), и W2 (5'-Cy5-CTTCTGTGAGTACCGTCATTATC-3'), которая была специально создана для распознавания 16S рНК бактерий *Wolbachia* (Heddi *et al.*, 1999). После гибридизации *in situ* образцы отмывали в течение 15 мин. при 48 °С в заранее подогретом буфере, после чего окрашивали в течение 5 мин. раствором фосфатного буфера, содержащим 1 мкг/мл 4, 6-диамидино-2-фенилиндол 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 °С до анализа с использованием лазерно-сканирующего конфокального микроскопа TCS SP5 (Leica, Австрия) и LSM 780 (Zeiss, Германия). Снимки получали на микроскопе LSM 780 в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН.

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

Статистические методы

Средние значения продолжительности жизни мух, содержащихся 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 χ^2 -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.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Продолжительность жизни линии *D. melanogaster*, не инфицированной и инфицированной *Wolbachia* штамма wMelPop, при различных температурных режимах

Постоянное содержание при 25 °С, 29 °С и 16 °С

При 25 °С 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 °С) оказала негативное влияние на среднюю ПЖ как неинфицированной, так и инфицированной линии *D. melanogaster*. У содержащихся при 29 °С 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 °С 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 значениями ПЖ самок и самцов наблюдались лишь при пониженной температуре.

Таблица 1. Средняя продолжительность жизни самок и самцов инфицированной *w1118* и неинфицированной *w1118T* бактериями *Wolbachia* линий *D. melanogaster* постоянно содержащихся при 25°C , 29°C и 16°C .

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

Содержание мух в течение 3, 7 и 13 суток при повышенной температуре (29°C) и последующий их перенос на пониженную температуру (16°C)

Тест на ПЖ заражённых и незаражённых *wMelPop* самок *D. melanogaster w1118* проводился при 4-х различных температурных режимах, обозначенных № 1, 2, 3 и 4. При режиме № 1 мух постоянно содержали при 16°C , и полученные данные по их ПЖ и выживаемости использовали в качестве контроля (см. выше). При режимах № 2, 3 и 4 мух выращивали при повышенной температуре (29°C) в течение 3, 7 и 13 дней, соответственно, затем переносили в условия пониженной температуры (16°C) до полной гибели насекомых. В условиях температурного режима № 2 средняя ПЖ неинфицированных самок и самцов мух уменьшилась по сравнению с контролем 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 незаражённых мух было аналогичным режиму № 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 до $62,4 \pm 3,9$ 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 наблюдалось 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.

Оптимальная температура развития *D. melanogaster* составляет 22°C (Petavy *et al.*, 2001). При её повышении сроки развития мух сокращаются и достигают минимума (8-9 дней) при 29°C . Было показано, что жизнеспособность *D. melanogaster* стабильна в диапазоне от 14°C до 26°C и падает до нуля при снижении температуры до 10°C или увеличении до 33°C (Petavy *et al.*, 2001). В нашей работе температура 29°C является стрессовой, но не критической температурой для *D. melanogaster*, она усиливает активность мух и соответственно ускоряет 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.

Таким образом, проведённые популяционные исследования ПЖ и выживаемости *D. melanogaster* показали, что перенос мух с повышенной на пониженную температуру способствует восстановлению ПЖ как инфицированных, так и неинфицированных особей, однако этот эффект пропадает после длительного (более 7 дней) содержания при 29°С. 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).

Структурная организация и распределение симбиотических бактерий *Wolbachia* в клетках мозга *D. melanogaster* при различных температурных режимах

Wolbachia штамма 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 ткани мозга взрослых *D. melanogaster* выделяют центральный комплекс, включающий в себя антеннальные доли и грибовидные тела, а также оптические доли, ламину и сетчатку. Клетки мозга располагаются в основном по периферии, а центральная часть ткани заполнена их отростками – дендритами и аксонами.

Ультраструктура и распределение *Wolbachia* в клетках мозга самок *D. melanogaster*, содержащихся постоянно при 25 °С, 29 °С и 16 °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 внешняя мембрана хозяйского происхождения (Рис. 1а, б). *Wolbachia* содержали большое количество рибосом и центрально расположенный дисперсный хроматин. В клетках выявлялись делящиеся *Wolbachia*, что свидетельствовало о нормальной функциональной активности бактерий (Рис. 1в).

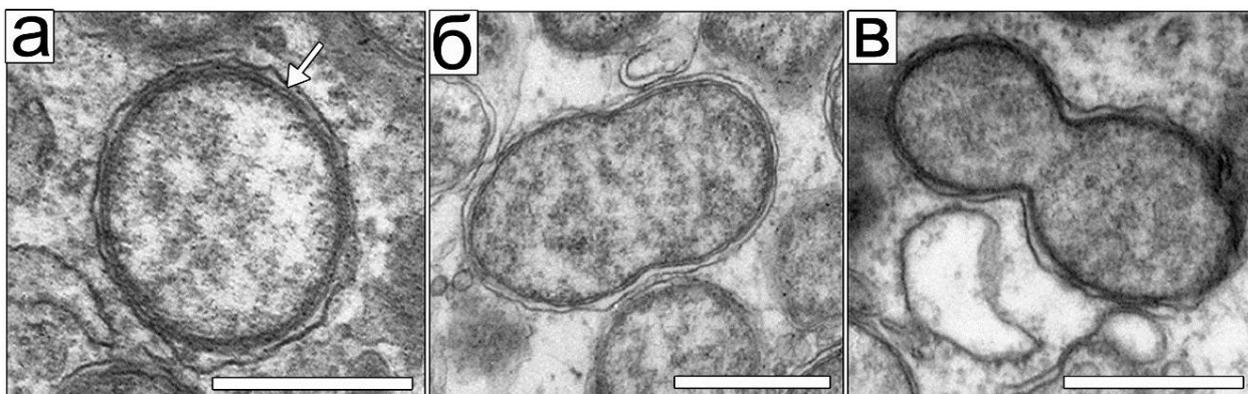


Рис. 1. Бактерии *Wolbachia* в клетках мозга *D. melanogaster*. а, б – коккоидная (а) и палочковидная (б) формы бактерий, белой стрелкой отмечена трёхслойная оболочка; в – делящаяся бактерия. Масштаб: 0,5 мкм.

Детальный электронно-микроскопический анализ показал, что бактерии *Wolbachia* встречаются в основном в нейронах (Рис. 2а, б, в) и клетках глии (Рис. 2г) ткани мозга *D. melanogaster*. На срезах аксонов и дендритов бактерий обнаружено не было. Следует отметить, что плотность бактерий в цитоплазме тел нейронов существенно варьировала от 1-50 эндосимбионтов на клетку до больших скоплений, часто заполняющих всю цитоплазму нескольких близлежащих клеток (Рис. 2а, б, в). Для сравнительной оценки действия температуры на плотность бактерий в цитоплазме нервных клеток нами были условно выделены три типа нейронов: первый – с низким содержанием *Wolbachia* (от 1 до 10 бактерий на срез тела нейрона); второй – нейроны со средней плотностью бактерий (10 – 50 бактерий на срезе тела нейрона) и третий – нейроны с максимальной плотностью бактерий (более 50 бактерий на срез тела нейрона) в цитоплазме. В клетках глии (Рис. 2г) число бактерий также варьировало, однако такой высокой плотности *Wolbachia*, как в телах нейронов третьего типа, в них обнаружено не было. Характер распределения бактерий в клетках мозга оптических долей и центрального отдела не различался.

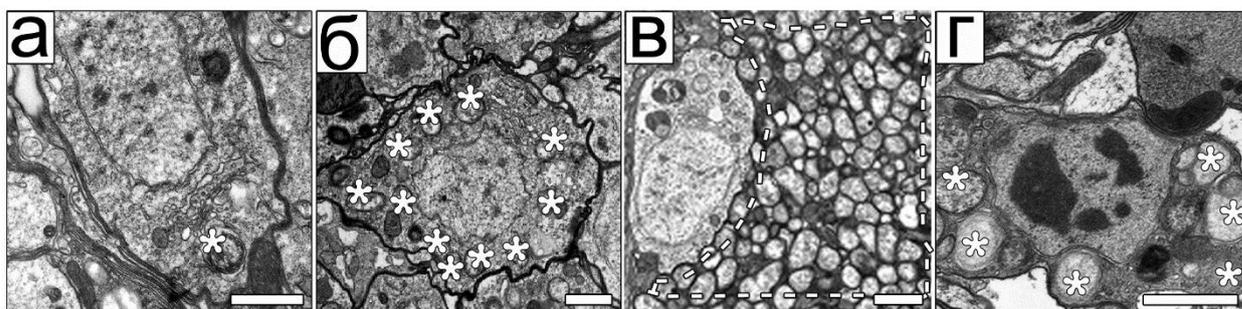


Рис. 2. Различная плотность *Wolbachia* в клетках мозга *D. melanogaster*. а – срез тела нейрона с одиночной бактерией в цитоплазме; б – срез тела нейрона, содержащий 11 бактерий в цитоплазме; в – срез нескольких нейронов, цитоплазма которых заполнена тесно расположенными бактериями (скопление бактерий обозначено пунктиром); г – бактерии в клетках глии. Бактерии отмечены звездочками. Масштаб: 1 мкм.

При содержании самок в условиях повышенной температуры в течение 3-х дней ультраструктура клеток мозга не отличалась от таковой при 25 °С. После 7-ми дней воздействия 29 °С морфология нейронов и клеток глии также не изменялась, чаще наблюдались большие скопления бактерий (третий тип нейронов). Необходимо отметить, что иногда среди большого скопления бактерий выявлялись палочковидные электронно-плотные структуры, напоминающие разрушающиеся бактерии. На 13-й день воздействия 29 °С, при сохранении ультраструктуры клеток мозга, в них наблюдались многочисленные крупные скопления *Wolbachia*, и часто встречались довольно большие агрегаты электронно-плотных структур.

Электронно-микроскопический анализ контрольной линии мух, содержащейся постоянно при 16 °С показал, что на протяжении 30 дней морфология нейронов и клеток глии не нарушается. Ультраструктура бактерий и их распределение в клетках мозга существенно не менялись по сравнению с контролем при 25 °С. 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. В клетках глии плотность бактерий не варьировала и составляла 1–10 бактерий на клетку.

Таким образом, увеличение времени содержания самок при повышенной температуре вызывало формирование большого количества электронно-плотных

структур, напоминающих деградирующие бактерии. Ультраструктура клеток мозга мух сохранялась при всех исследованных температурных режимах.

Ультраструктура и распределение *Wolbachia* в клетках мозга самок *D. melanogaster* при содержании мух на повышенной температуре (29 °С) и последующем их переносе на пониженную (16 °С) температуру

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

Ультраструктура клеток мозга *D. melanogaster* после 3-х дней содержания при повышенной температуре и последующего переноса на 16 °С не изменялась по сравнению с контролем (постоянное содержание при 16 °С). Титр бактерий в клетках мозга, преимущественно в нейронах, немного увеличивался. Часто встречались нейроны второго типа, и снижалось количество нейронов первого типа. В клетках глии плотность *Wolbachia* оставалась неизменной по сравнению с контролем.

После 7 дней содержания мух при 29 °С и последующего переноса на 16 °С ультраструктура нейронов и клеток глии не отличалась от контроля, однако количество *Wolbachia* в телах нейронов, а также в клетках глии увеличивалось. Бактерии в телах нейронов формировали плотные скопления, занимающие пространство нескольких прилегающих клеток. На границе скоплений иногда выявлялись расширенные межклеточные полости, образующиеся, возможно, в результате разрушения клеток мозга вследствие активной пролиферации бактерий. В этих участках иногда наблюдались *Wolbachia*. В клетках глии количество бактерий варьировало от 1 до 15 и больших скоплений не обнаруживалось. В телах нейронов помимо типичных бактерий *Wolbachia* со светлым матриксом, нами были обнаружены электронно-плотные структуры с тройной оболочкой, напоминающие деградирующие бактерии.

При содержании мух в течение 13 дней при повышенной температуре и последующем их переносе на 16 °С ультраструктура клеток мозга почти не изменялась, хотя в ядрах нейронов появлялись многочисленные глыбки компактного хроматина. Бактерии образовывали большие скопления, занимающие пространство нескольких клеток, в основном нейронов. Помимо типичных скоплений бактерий, часто встречались крупные скопления электронно-плотных структур, которые обнаруживались также под оболочкой мозга *D. melanogaster* (Рис. 3). Кроме того, в этой области выявлялись многочисленные фрагменты разрушенных клеток.

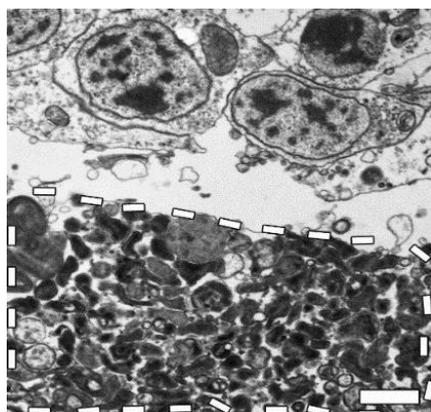


Рис. 3. Крупное скопление бактерий в виде электронно-плотных структур (указано пунктиром) под оболочкой мозга мух после предварительной обработки 29 °С в течение 13 дней и последующем переносе на 16 °С.

Таким образом, проведённые исследования подтвердили, что выявленный с помощью популяционного эксперимента период содержания мух при 29 °С (7–13 дней) является критическим для выживания мух. 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.

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 при воздействиях повышенной температуры в периоде от 7 до 13 дней гибель *Wolbachia* штамма «MelPop» происходит в результате активации второй системы апоптоза. Активное размножение бактерий в клетках мозга при 29 °С приводит к образованию больших скоплений эндосимбионтов и нехватке питательных веществ, что является стрессовой ситуацией для *Wolbachia*. Также известно, что, вследствие нехватки питания, в матриксе бактерий образуются электронно-плотные нерастворимые белковые скопления, или тельца включения. Они выступают в роли запасённого источника энергии, необходимого для дальнейшей жизнедеятельности микроорганизмов (de Groot *et al.*, 2008; Talafova *et al.*, 2013). Обнаруженные в нашем исследовании электронно-плотные структуры, возможно, являются новой жизненной формой бактерий *Wolbachia*, формирующейся при их попадании в стрессовые условия.

2. 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 этого метода было решено получить точные данные о распределении бактерий *Wolbachia* в ткани мозга *D. melanogaster* на разных этапах развития хозяина. Анализ ЦНС личинок 3-го возраста выполнялся с помощью тотальной флуоресцентной гибридизации *in situ* на 5-й и 7-й дни развития при 25 °С и 29 °С. У куколок образцы мозга были проанализированы на ранней, средней и поздней стадиях. Ткань мозга взрослых самок (надглоточный и подглоточный ганглии) была проанализирована на 1-й, 3-й, 7-й и 13-й дни после вылета имаго.

Распределение и тип 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. Аналогично тому, как это было сделано для электронной микроскопии, мы условно разделили клетки на первый тип (1–10 бактерий на конфокальный срез клетки), второй тип (10–200 бактерий на конфокальный срез клетки) и третий тип (клетки, содержащие от 200 до 10 тыс.

бактерий на конфокальный срез нескольких клеток, цитоплазма которых полностью забита *Wolbachia*).

ЦНС личинок 3-го возраста разделяется на две основные части: брюшной нервный ствол (БНС), представленный сетью билатерально симметричных сегментов (нейромеров) и мозг, состоящий из двух сферических долей, по краям которых располагаются зачатки оптических долей. Нейробласты ЦНС личинки, предшественники нейронов и клеток глии, располагаются в основном в центральном мозге, подглоточном ганглии и в центре сегментов БНС (Truman, 1990).

Локализация *Wolbachia* в ЦНС личинок третьего поколения на 5-й день развития при 25 °С (Рис. 4а) была сходной с локализацией бактерий при 29 °С (Рис. 4б). 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 нервные клетки второго типа, содержащие от 10 до 200 бактерий на конфокальный срез, хотя встречались также клетки нейроны первого типа (1-10 бактерий на конфокальный срез). На краях сегментов и в зачатках оптических долей были обнаружены нервные клетки только первого типа, причём количество клеток с бактериями было невелико (~ 5 – 10 %). Необходимо отметить, что локализация флуоресцентной метки в области центральных сегментов БНС, совпадала с распределением в них нейробластов.

На 7-й день развития как при 25 °С (Рис. 4в), так и при 29 °С (Рис. 4г) характер распределения *Wolbachia* в ЦНС личинок третьего поколения существенно не изменялся по сравнению с 5-м 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.

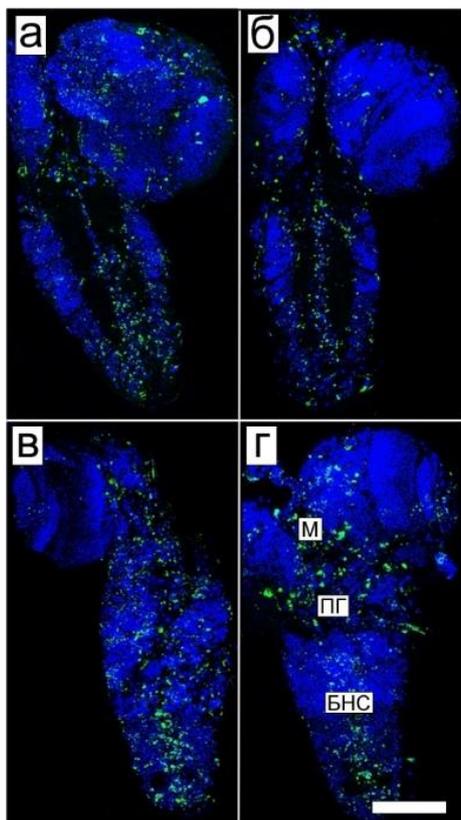


Рис. 4. Флуоресцентная гибридизация *in situ* ЦНС личинки третьего возраста *D. melanogaster* с использованием универсальной бактериальной пробы EUB338 (зелёный цвет). а, в – 5-й и 7-й дни развития, соответственно, при 25 °С. б, г – 5-й и 7-й, день развития, соответственно, при 29 °С. *Wolbachia* локализуется в основном в брюшном нервном стволе (БНС), подглоточном ганглии (ПГ) и центральном мозге (М). Синий цвет – ядра, окрашенные DAPI. Масштаб: 100 мкм.

Распределение и тип бактерий Wolbachia в клетках мозга куколок D. melanogaster при 25 °С и 29 °С

С помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* мы показали, что на всех стадиях метаморфоза *D. melanogaster* (ранняя, средняя и поздняя куколка) в клетках формирующейся ЦНС *Wolbachia* локализуются в основном в центральных областях мозга, как при 25 °С, так и при 29 °С (Рис. 5а, б, в, г, приведены последние две стадии куколки), что аналогично картине, описанной выше у личинок 3-го возраста. По полученным изображениям сигнала бактерий в мозге мух было выдвинуто предположение, что лишь на стадии «поздней» куколки при 29 °С происходит заметное увеличение плотности бактерий (Рис. 5г).

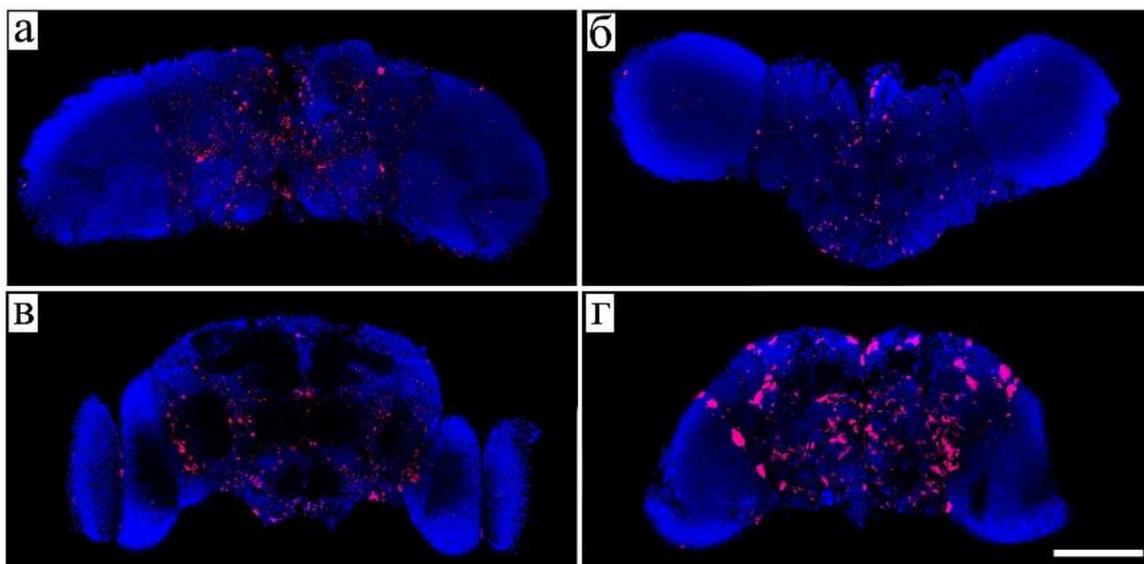


Рис. 5. Флуоресцентная гибридизация *in situ* мозга куколок *D. melanogaster* с использованием *Wolbachia* специфичной пробы W2 (розовый цвет). а, в – «средняя» и «поздняя» куколка при 25 °С, соответственно. б, г – «средняя» и «поздняя» куколка при 29 °С, соответственно. *Wolbachia* локализуются в основном в центральном отделе. На стадии «поздней» куколки при 29 °С (г) заметно увеличение плотности бактерий. Синий цвет – ядра, окрашенные DAPI. Масштаб: 100 мкм.

Распределение и тип 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. В данной работе у взрослых мух анализировалась только ткань мозга. Клетки БНС взрослых мух в перечень объектов нашего исследования не входили. На 1-й день после вылета имаго при 25 °С бактерии *Wolbachia* локализовались в основном в подглоточном и надглоточном (верхний протоцеребрум, антеннальные доли и оптические доли) ганглиях мозга мух и имели наименьшую плотность в оптических долях (Рис. 6а). 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 плотность бактерий в клетках была резко увеличена по сравнению с 25 °С (Рис. 6б). Особенно это было заметно в районе подглоточного и

надглоточного ганглиев. В этих областях мозга, помимо первой и второй групп нейронов, выявлялись клетки третьей группы, забитые бактериями. Однако в ламине и сетчатке существенных изменений в титре бактерий обнаружено не было. На 3-й 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. 6в, г). На 7-й день после вылета имаго разница между плотностью бактерий при 25 °С и при 29 °С становилась более заметной, хотя картина распределения бактерий сохранялась (Рис. 6д, е). К 13-му дню титр *Wolbachia* в ткани мозга мух, содержащихся при 25 °С, существенно не возрастал (Рис. 6ж), а при 29 °С к 13-му дню бактерии активно пролиферировали и заполняли практически всё пространство нервных клеток в области подглоточного и надглоточного ганглиев, а также ламины и сетчатки мозга мух (Рис. 6з).

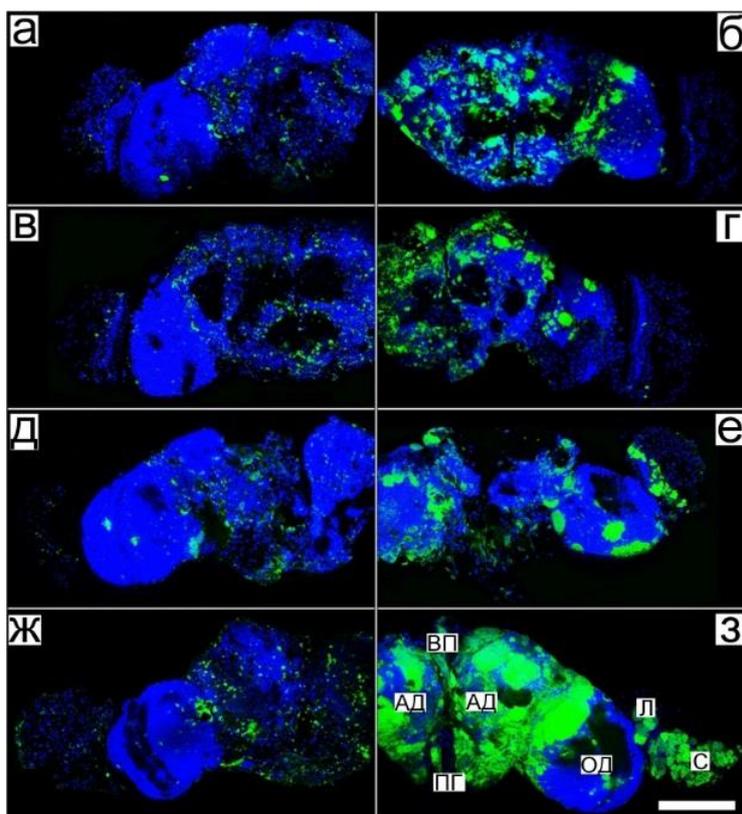


Рис. 6. Флуоресцентная гибридизация *in situ* мозга взрослых *D. melanogaster* с использованием бактериоспецифичной пробы EUB338 (зелёный цвет), демонстрирующая различия в количестве бактерий в клетках после разных периодов температурного воздействия. а, в, д, ж – 1-й, 3-й, 7-й и 13-й дни, соответственно, содержания при 25 °С после вылета имаго. б, г, е, з – 1-й, 3-й, 7-й и 13-й дни, соответственно, содержания при 29 °С после вылета имаго. Синий цвет – ядра, окрашенные DAPI Масштаб: 100 мкм.

Сравнительный анализ плотности Wolbachia в центральной нервной системе личинок 3-го возраста, клетках мозга куколок и взрослых D. melanogaster, содержащихся при 25 °С и 29 °С

Для того, чтобы оценить и сравнить более точно динамику плотности бактерий в ЦНС личинок, а также ткани мозга куколок и взрослых мух, нами был проведён количественный анализ титра *Wolbachia* с помощью программы ImageJ. Плотность бактерий выражалась в виде отношения площади, занимаемой бактериями на конфокальном срезе мозга, к площади всего мозга на этом же конфокальном срезе. Для личинок 3-го возраста анализировались центральный мозг, подглоточный ганглий и зачатки оптических долей. Для куколок и 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-м днём после вылета имаго, относительная плотность *Wolbachia* слегка увеличивается с 1.76 ± 0.13 до 4.5 ± 0.19 (Рис. 7). Установлено, что повышенная температура оказывает более существенное влияние на

относительную плотность бактерий в клетках мозга мух, значительно увеличивая её с 1.7 ± 0.11 на стадии личинки (5-й день развития) до 16.2 ± 1.79 на 13-й день после вылета имаго (Рис. 7). Необходимо отметить, что различия в относительной плотности бактерий в ткани мозга мух, содержащихся при разных температурах, были статистически значимыми только начиная со стадии поздней куколки ($P < 0.006$) при 29°C , что коррелировало с визуальным анализом изображений и подтверждало выдвинутую выше гипотезу.

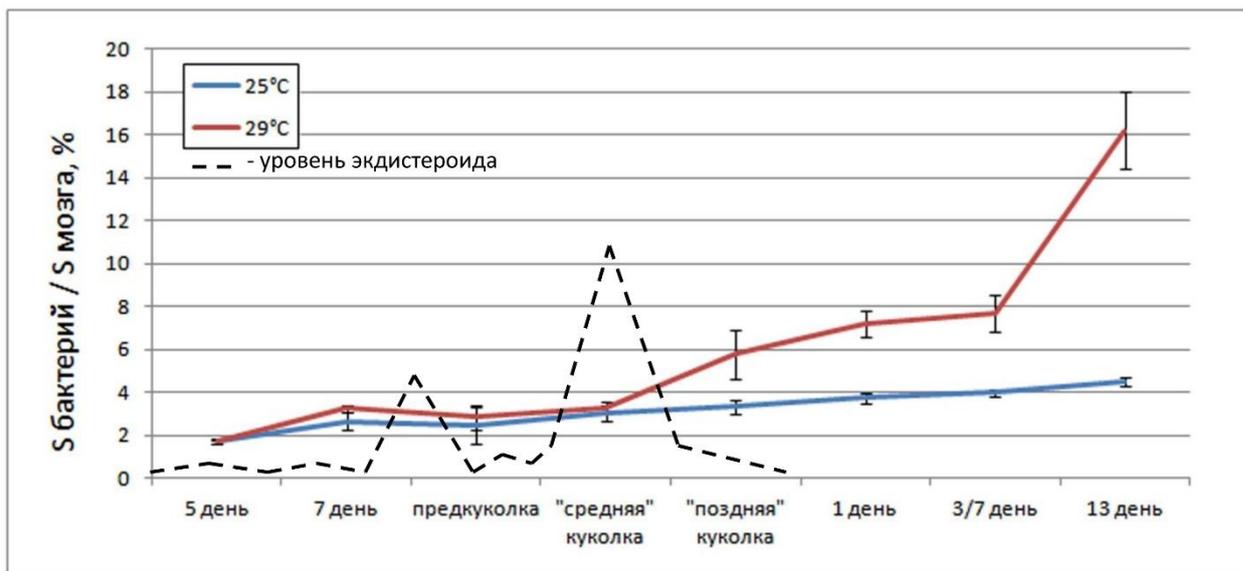


Рис. 7. График, демонстрирующий динамику титра *Wolbachia* в клетках мозга *D. melanogaster* на стадии личинки 3-го возраста (5-й и 7-й день развития), куколки («предкуколка», «средняя» куколка, «поздняя» куколка) и взрослой мухи (1-й, 3/7-й и 13-й день после вылета имаго) при 25°C (синий) и 29°C (красный)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

Отсутствие влияния 29°C на титр *Wolbachia* в клетках ЦНС личинок 3-го возраста может объясняться наличием большого количества пассивных нейронов и клеток глии, в которых не происходит активного синтеза питательных веществ, необходимых для интенсивного размножения штамма *wMelPop*. Во время метаморфоза происходит всплеск клеточной активности, запускаемый двумя пиками экдистероидов. Первый пик, сразу после окукливания, затрагивает «молчащие» клетки мозга личинки, которые активируются и между ними начинается процесс формирования новых связей. Второй и самый большой пик гормонов на стадии куколки (между «средней» и «поздней») регистрируется позднее и связан с созреванием и синаптогенезом специфических нейронов для взрослого мозга насекомого, которые были сохранены во время развития личинки (Truman, Reiss, 1995; Truman, 1996). Показано, что повышенная температура может увеличивать экспрессию экдистероидов, ускоряя время прохождения стадии куколки. Быстрая активация личиночных и специфических взрослому мозгу нейронов при 29°C 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 наружной 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 на этой стадии развития насекомого.

Характер распределения Wolbachia в разных отделах мозга взрослых D. melanogaster закладывается в раннем эмбриогенезе при формировании ЦНС мух

Известно, что в процессе раннего нейрогенеза из одного нейробласта образуется самообновляющаяся клетка (нейробласт) и меньшего размера ганглиозная материнская клетка (ГМК), дающая впоследствии нейроны и клетки глии (Egger *et al.*, 2008). Показано, что во время такого ассиметричного деления *Wolbachia* перемещаются в формирующийся нейробласт, но не отходят в ГМК (Albertson *et al.*, 2009). Эффективность разделения бактерий по формирующимся клеткам зависит от штамма *Wolbachia*. По сравнению со штаммами wRi и wMel, патогенный штамм wMelPop имеет наибольшую вероятность попасть в небольшом количестве и в ГМК (Albertson *et al.*, 2009). Согласно нашим результатам в ЦНС личинки 3-го возраста при 25 °C *Wolbachia* штамма wMelPop предпочтительно инфицируют области в центре базальных сегментов БНС и мозга, и наибольшая плотность бактерий соотносится с положением нейробластов. 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). Таким образом, гетерогенность распределения бактерий *Wolbachia* формирующаяся во время нейрогенеза сохраняется в мозге на стадии личинки 3-го возраста и куколки.

По нашим данным у взрослых мух 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. 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. Интенсивный нейрогенез во время постэмбрионального периода и эффективный способ пролиферации нейробластов в центральном мозге личинок приводят к широкому распространению *Wolbachia* в ткани мозга взрослой мухи, а активная пролиферация бактерий в нейронах и клетках глии обеспечивает увеличение их плотности. Согласно проведенным нами исследованиям, высокая температура ускоряет пролиферацию бактерий в нервных клетках. При максимальном заполнении бактериями цитоплазмы нейронов происходит разрыв клеток и выход бактерий под оболочку мозга, что необратимо приводит к гибели насекомого.

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.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

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.

4. **Струнов А.А.**, Илинский Ю.Ю., Киселёва Е.В. Исследование влияния температурного стресса на поведение и ультраструктуру бактерий *Wolbachia* (штамм wMelPop) в клетках мозга *Drosophila melanogaster* // Материалы 14-й Международной Пушчинской школы-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века». Пушино, 2010. С. 265.

5. **Струнов А.А.**, Киселёва Е.В. Выбор оптимальной фиксации клеток мозга *Drosophila melanogaster* для электронно-микроскопического исследования структурной организации и поведения эндосимбионта *Wolbachia* (штамм wMelPop) в организме хозяина // Тезисы докладов XXIII Российской конференции по электронной микроскопии. Черноголовка, 2010. С. 432.

6. **Струнов А.А.** Популяционный и электронно-микроскопический анализ влияния температурного стресса на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster*, инфицированной штаммом *Wolbachia* wMelPop // Материалы XLVIII Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс». Новосибирск, 2010. С. 245.
7. **Струнов А.А.**, Киселёва Е.В. Гетерогенность строения бактерий патогенного штамма *Wolbachia* wMelPop в клетках мозга *Drosophila melanogaster* // Материалы 15-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века». Пущино, 2011. С. 364.
8. Захаров И.К., Ваулин О.В., Илинский Ю.Ю., Быков Р.А., Киселёва Е.В., **Струнов А.А.**, Жукова М.В., Коромыслов Ю.А., Васильева Л.А., Антоненко О.В., Волошина М.А., Захаренко Л.П., Иванников А.В., Юрченко Н.Н. Генетика природных и экспериментальных популяций дрозофил // Международная конференция «Проблемы популяционной и общей генетики». Москва, 2011. С. 68.
9. **Струнов А.А.**, Жукова М.В., Киселева Е.В. Исследование продолжительности жизни *Drosophila melanogaster*, инфицированной *Wolbachia* штамм wMelPop при повышенной температуре // Международная конференция «Проблемы популяционной и общей генетики». Москва, 2011. С. 91.
10. Быков Р.А., **Струнов А.А.**, Жукова М.В., Калмыкова Е.А., Илинский Ю.Ю., Киселева Е.В., Захаров И.К. Полиморфизм природных популяций – влияние факторов внешней среды и взаимодействие генов и геномов в симбиотической системе «*Wolbachia-Drosophila melanogaster*» // Программа фундаментальных исследований Президиума РАН. “Биологическое разнообразие”. Подпрограмма “Генофонды и генетическое разнообразие”. Материалы отчетной конференции. Москва: ИОГен. 2011. С. 54-56.
11. **Струнов А.А.**, Киселева Е.В. Электронно-микроскопический анализ локализации эндосимбиотических бактерий *Wolbachia* (штамм wMelPop) в клетках мозга *Drosophila melanogaster* // Тезисы докладов XXIV Российской конференции по электронной микроскопии. Черногоровка, 2012. С. 494.
12. **Strunov A.A.**, Kiseleva E.V. Distribution of *Wolbachia* strain wMelPop in *Drosophila melanogaster* brain cells analyzed with electron microscopy // 7th International *Wolbachia* Conference. June 7-12, 2012, Oleron Island, France, Abstract Book, P. 98.
13. **Strunov A.A.**, Kiseleva E.V., Gottlieb Y. Effect of high temperature on distribution of pathogenic *Wolbachia* strain wMelPop in *Drosophila melanogaster* brain cells // EU COST Action FA0701 Summit Meeting. June 12-13, 2012, Oleron Island, France, Abstract Book, P. 78.
14. **Strunov A.**, Gottlieb Y., Kiseleva E. *Wolbachia* bacteria invade central regions of the *Drosophila* brain: illness or delicate mechanism of influence on insect behavior? // XIII European Symposium for Insect Taste and Olfaction. 22-28 September 2013, Villasimius, Italy. Abstract book, P. 6.