

Эколого-генетические модели

Лекция 3.

Раздел посвящен изучению
генетического контроля
синэкологических отношений.

Метаболическая интеграция партнеров модель дрожжи – дрозфила.

Насекомые, как и все членистоногие, не способны синтезировать **стерины** – обязательные структурные компоненты животных клеток.

Стерины насекомых связываются с белками и сложными липидами и образуют липопротеидные мембраны, которые осуществляют и регулируют многие метаболические функции клетки.

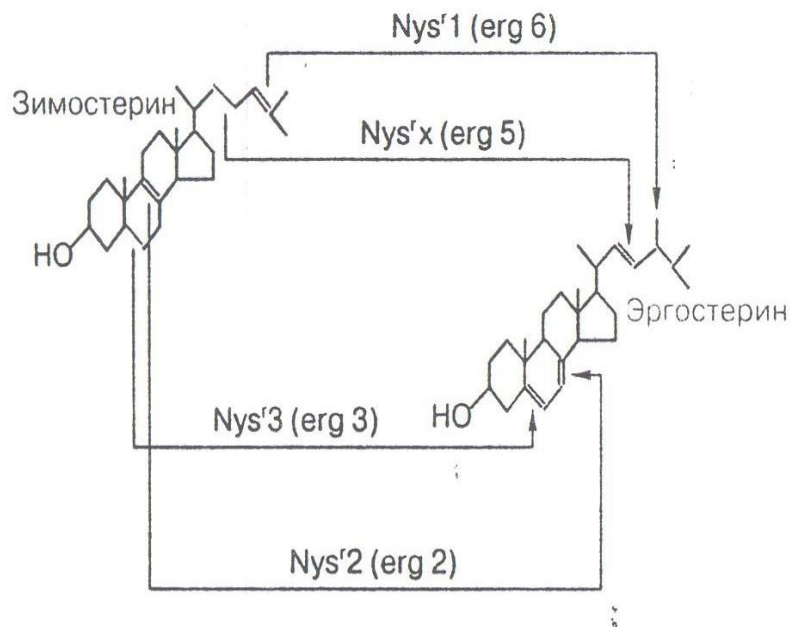
Следовательно, насекомые должны получать с пищей, по крайней мере, два незаменимых структурных компонента клеточных мембран: холин и стерины.

Холестерин известен как наиболее распространенный стероид насекомых.

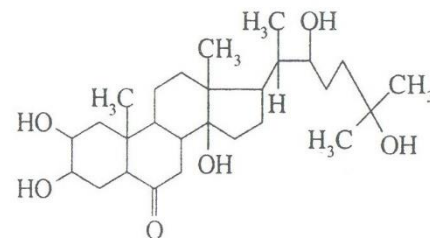
Заключительные этапы биосинтеза стероидов у дрожжей можно блокировать мутациями устойчивости к полиеновому антибиотику нистатину, который связывается со стеринами клеточных мембран и препятствует размножению клеток.

Дрожжи дикого типа не растут на среде с нистатином. Блок синтеза эргостерина приводит к устойчивости к нистатину.

Мутации по биосинтезу стероинов



- Гормоны линьки – экдизоны относятся к стероидным гормонам и представляют собой производное циклопентан-пергидрофенантрена (например, α -экдизон)



Частота потерь половых хромосом у дрозофилы.

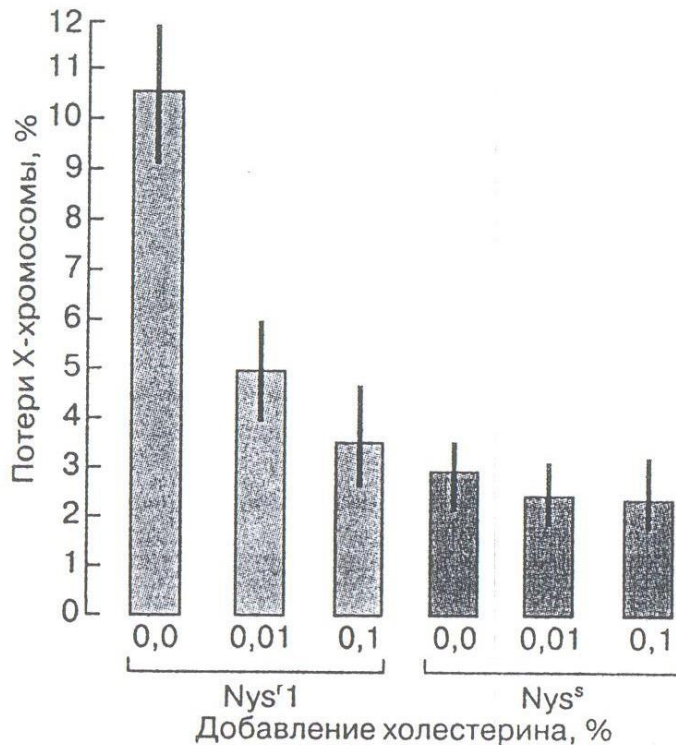
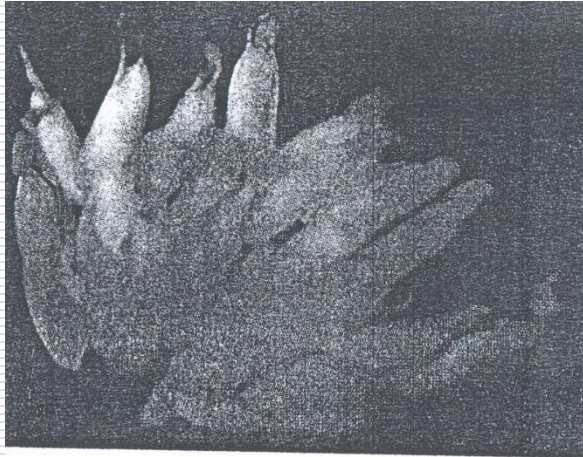


Рис. 2. Влияние стерина на частоту потерь хромосом, индуцированную рентгеновыми лучами (доза 1000 P), в ооцитах дрозофилы, питавшейся дрожжами, устойчивыми к нистатину (Nys^r1), в сравнении с тем же показателем для дрозофилы, питавшейся дрожжами, чувствительными к этому антибиотику (Nys^s). Видно, что в вариантах с дрожжами, устойчивыми к нистатину (с нарушениями метаболизма стерина), добавление холестерина снижает частоту потерь хромосом до контрольного уровня, то есть до уровня, характерного для дрозофилы, питавшейся дрожжами, чувствительными к антибиотику (с нормальным стеринным метаболизмом)

Редукция гонад у дрозофилы.



Яичники
дрозофилы,
питавшейся гомогенатом растения
табака:
а).чувствительного и
б).устойчивого к
нистатину

Табак и устойчивость к нистатину.

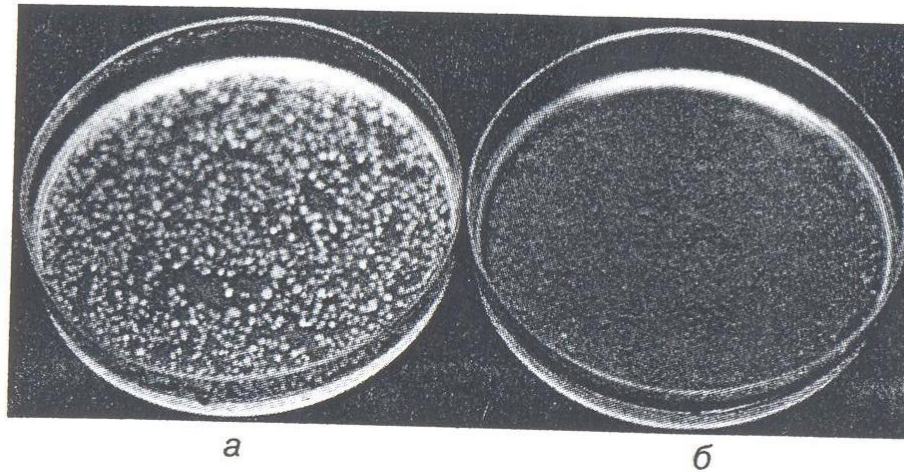


Рис. 3. Фотографии чашек Петри, на которые высеяны клетки табака: *а* – мутантные, устойчивые к нистатину; *б* – клетки исходной формы, чувствительной к антибиотику. В обе чашки добавлен антиметаболит стериннов – триадимефон. Очевидно, что мутантные клетки проявляют устойчивость и к этому соединению в отличие от клеток исходной формы

Профиль стерина у мутантов и дикого типа табака.

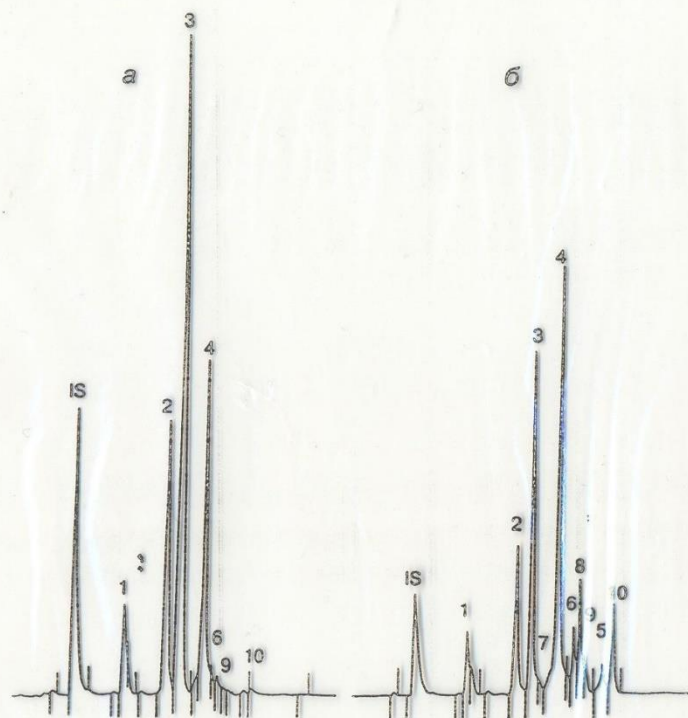
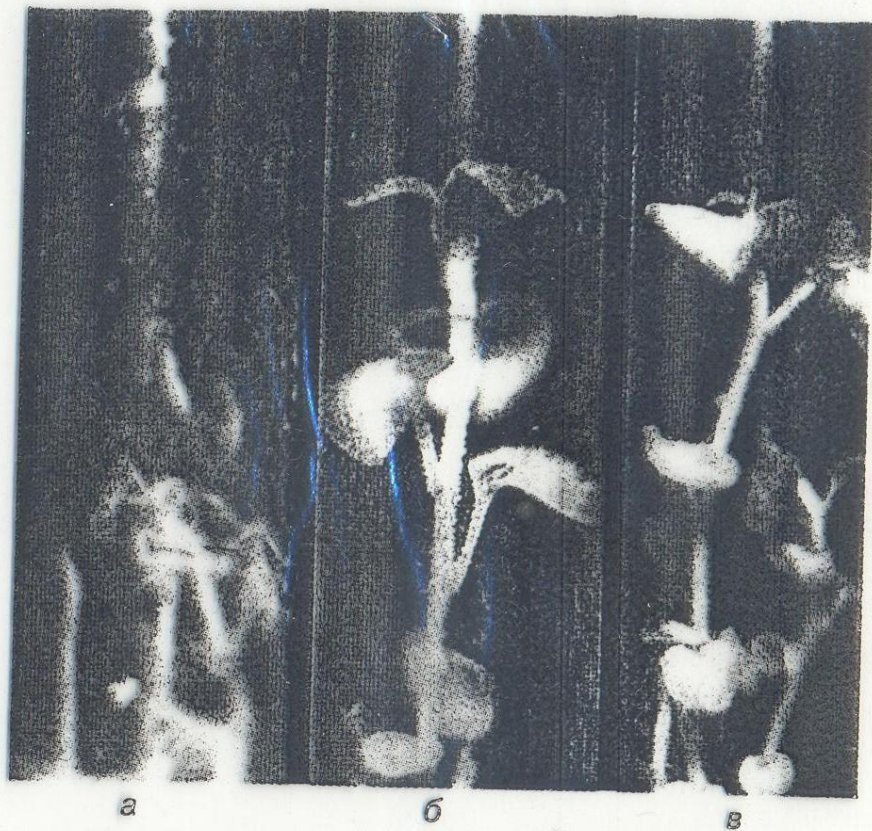


Рис. 5. Профиль стерина (результаты газожидкостной хроматографии), синтезируемых растениями-регенерантами, полученными из клеток дикого типа, чувствительных к нистатину (а) и мутантных, устойчивых к этому антибиотику (б). Различные стеринны обозначены цифрами над пиками, высота которых отражает относительное содержание каждого стерина. Очевидно, что общее содержание и соотношение некоторых стерина изменены у мутанта

Устойчивость к фитофторозу.



Реакция на заражение фитофторой растений-регенерантов картофеля: а). чувствительного, полностью уничтоженного, б, в). устойчивого к филипину

Модельная система межорганизменного взаимодействия:

кактус – микроорганизм - дрозофила

- ❑ Пустыня Сонора, исследования 40 лет
 - ❑ 4 вида эндемичной дрозофилы
 - ❑ Мухи питаются и размножаются в некротических тканях 5 видов колонообразных кактусов
 - ❑ Бактерии и дрожжи, обитающие в некротических тканях
-

Видоспецифичность взаимодействия дрозофилы и кактусов

- *D.paheea* – *Lophocereus schottii*
 - *D.nigrospiracula* – *Carnegiea gigantea*
 - *D.mojavensis* – *Lemairocerus thurberi*
 - *D.arizonensis* – *Rathbunia alamosensis*
-

Метаболическая интеграция:

- Кактусы всех 4 видов привлекают дрозophil наличием стероидных аттрактантов, необходимых для синтеза гормонов линьки (*D. pachea* – 7-сигмастерин кактуса)
 - Кактусы каждого вида вырабатывают свой алкалоид-репеллент, отпугивающий все виды дрозophil, кроме одного, собственного вида
-

Кактусы содержат большое многообразие химических соединений, которые исходно отвечают за высоко специфичный тип утилизации хозяйского растения, осуществляемой пустынной формой дрозофилы.

Растительные метаболиты посредством эффекта на продуцируемые микробами летучие компоненты (аттрактанты) вовлекаются в хозяйскую специфичность: мухи привлекаются к некрозу растения определенного вида.

Метаболические активности микроорганизмов, живущих в некротических тканях, определяют увеличение или уменьшение токсичности субстрата.

Растительные метаболиты (углеводородный профиль) могут воздействовать на поведение спаривания у дрозофилы.

Моллюск *Elysia viridis* – водоросль *Codium fragile*

- Связь трофической цепи и биохимического симбиоза: морской моллюск *Elysia viridis* питается водорослью *Codium fragile*. Он ухитряется переселить хлоропласты съеденных водорослей в свои собственные клетки и долгое время сохранять их там живыми, приобретая, таким образом, способность к фотосинтезу.
-

Симбиоз беспозвоночных и бактерий рода *Wolbachia*

Бактерии **рода *Wolbachia*** относятся к цитобионтам, которые поселяются в генеративных клетках и передаются через цитоплазму яйцеклеток. Они найдены у 15-20% видов насекомых, а также у паукообразных, ракообразных, нематод.

Кроме вертикальной, они способны передаваться горизонтально между разными родами насекомых и даже между насекомыми и ракообразными.

Видовое разнообразие симбиозов бактерий рода *Wolbachia*

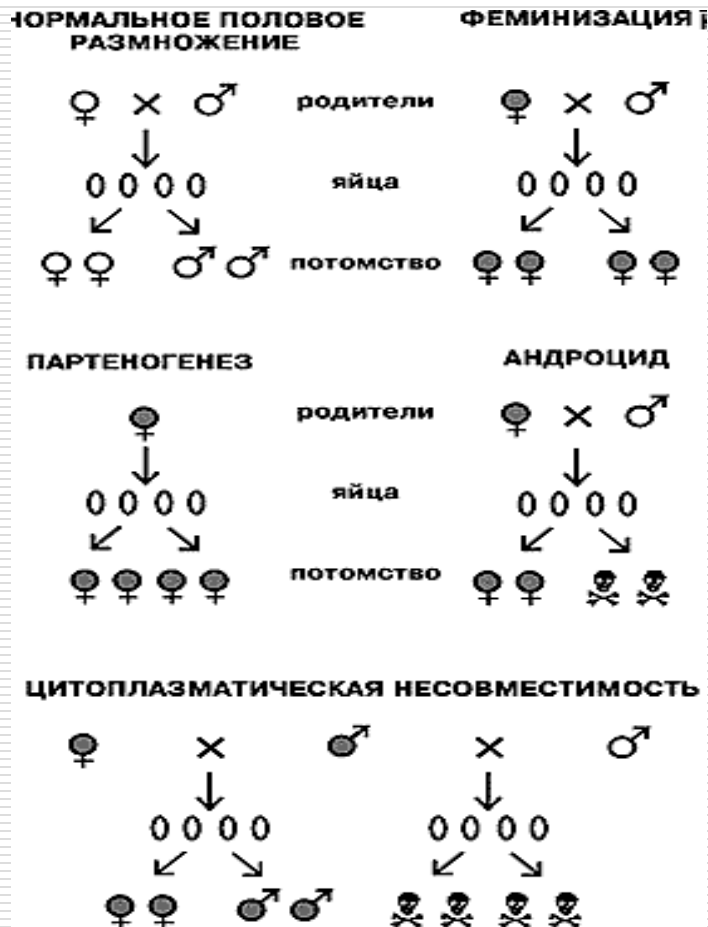
Модификации полового размножения у членистоногих под влиянием цитоплазматических симбионтов

Модификация	Хозяин: вид (систематическое положение)	Симбионт: цитоплазматическая бактерия
Цитоплазматическая несовместимость	<i>Culex pipiens</i> (двукрылые) <i>Ephesia cautella</i> (чешуекрылые) <i>Nasonia vitripennis</i> (перепончатокрылые) <i>Tribolium confusum</i> (жесткокрылые)	<i>Wolbachia pipientis</i> <i>Wolbachia</i> sp. то же то же
Феминизация	<i>Armadillidium vulgare</i> (равноногие ракообразные)	то же
Партеногенез	<i>Trichogramma</i> sp. (перепончатокрылые)	то же
Андроцид	<i>Drosophila willistoni</i> (двукрылые) <i>Nasonia vitripennis</i> (перепончатокрылые) <i>Adalia bipunctata</i> (жесткокрылые)	<i>Spiroplasma</i> sp. <i>Androcidium nasoniae</i> <i>Rickettsia</i> sp.

Биологические эффекты.

- ❑ Особенностью бактерий рода *Wolbachia* является их действие на репродуктивную систему видов-хозяев, поэтому их называют “репродуктивными паразитами”.
 - ❑ Необходимы для нормального протекания оогенеза (паразитическая оса *Asobara tabida*).
 - ❑ Частичная компенсация эффекта мутации гена *Sex-lethal (Sxl)*, управляющего половой детерминацией соматических клеток у дрозофилы.
-

Типы репродуктивных нарушений при симбиозе с бактериями р. Wolbachia



- Большинство насекомых – *цитоплазматическая несовместимость*.
- Перепончатокрылые – *партеногенез*.
- Ракообразные – *феминизация*.
- Жесткокрылые – *андроцид*.

И.А.Захаров-Гезехус (1934)



- “Бактерии управляют половым размножением насекомых”, Природа, №5, 1999.
 - “Влияние генотипического окружения хозяина – дрозофилы – на биологические эффекты эндосимбионта вольбахии”, Цитология, №4, 2009.
-

Изучение ультраструктуры взаимодействия дрософила-вольбахия

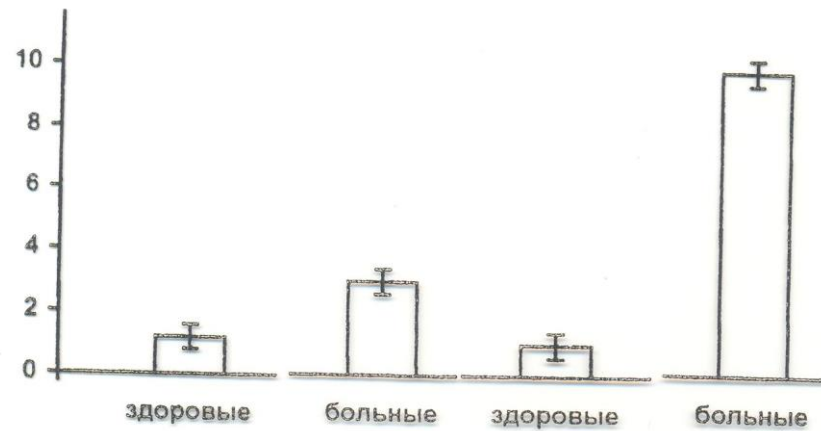
- Аллели *Trl362* и *Trlen82* - гипоморфные мутации по гену *Trithorax-like*, кодирующему многофункциональный белок GAGA. Нарушение в экспрессии гена *Trl* приводит к дефектам в онтогенезе дрософилы. Самки, несущие в гомозиготе мутации *Trl362* и *Trlen82*, являются полностью или частично стерильными.
-

Задача исследования:

- Сравнительное исследование морфологии клеточных структур здоровых и зараженных бактериями вольбахия линий дрозофилы, несущих мутации по гену *Trithorax-like*, а также сравнительное исследование структуры самих симбиотических бактерий и изучение влияния бактерий на жизнеспособность и плодовитость мух.
-

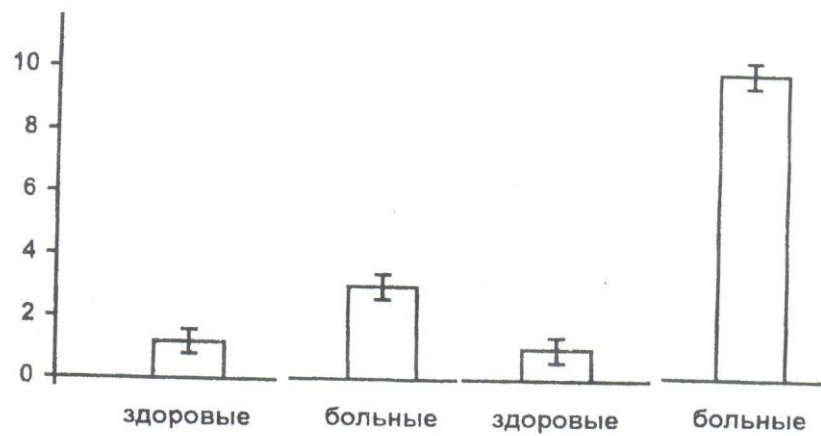
Результаты электронно-микроскопического анализа.

- В эмбрионах анализируемых линий содержатся типичные бактерии вольбахия, контактирующие с различными компартментами клетки хозяина;
 - В цитоплазме эмбрионов мутантной линии выявлены морфологически атипичные митохондрии и бактерии необычной морфологии с измененной формой мембранных оболочек;
 - У имаго зараженной линии продолжительность жизни существенно ниже, чем у мух мутантных линий.
-



коренные жители (ханты и манси) приехавшие в Сибирь

Рис. 1. Число клеток с нарушениями в структуре и числе хромосом в крови коренных и некоренных жителей Сибири, пораженных описторхами



коренные жители (ханты и манси) приехавшие в Сибирь

Рис. 1. Число клеток с нарушениями в структуре и числе хромосом в крови коренных и некоренных жителей Сибири, пораженных описторхами



Рис.13. Уровень клеток с патологическими митозами в культуре Т-лимфоцитов после воздействия вируса Эпштейна-Барр и антигена из яиц описторхисов при сравнении с контролем. Знаком * обозначено достоверное отличие от контроля ($P < 0,01$)

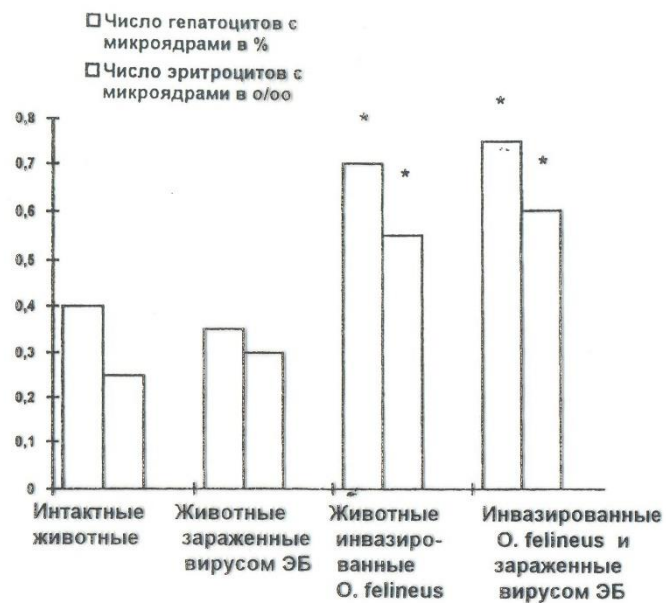
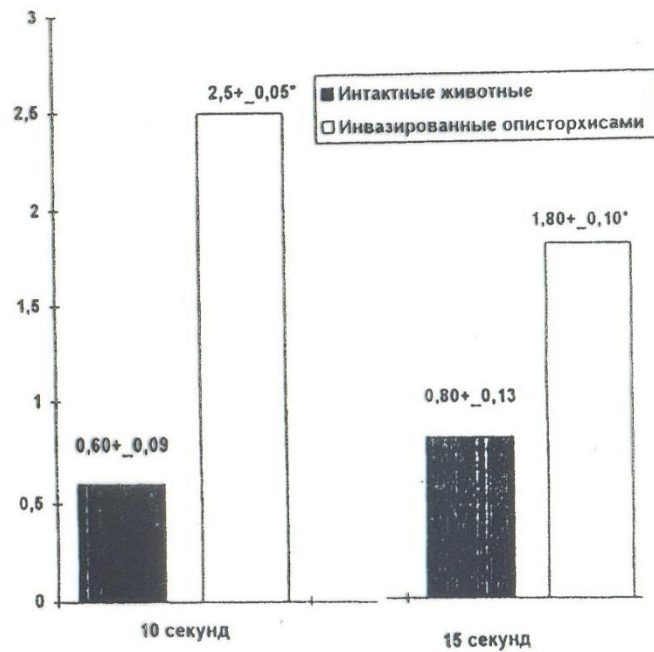
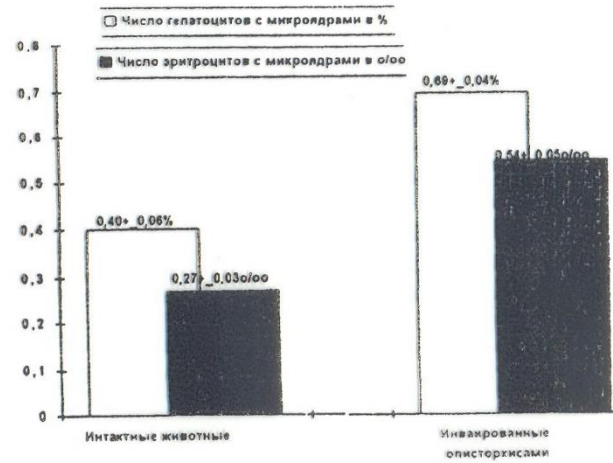


Рис. 32. Уровни эритроцитов и гепатоцитов с микроядрами у морских свинок в группах животных, зараженных только *O. felinus* или только вирусом Эпштейна-Барр, а также в группе, сочетанно инфицированной вирусом Эпштейна-Барр и *O. felinus*, в сравнении с контролем. Знаком * обозначено достоверное отличие с контролем ($P < 0,01$)



*Рис. 20. Индекс стимуляции внепланового синтеза ДНК в лимфоидных клетках периферической крови у золотистых хомяков, инвазированных *O. felinus**



*Рис. 19. Количество эритроцитов и гепатоцитов с микродрами у золотистых хомяков, инвазированных *O. felinus**



Рис. 15. Количество эритроцитов и лимфоцитов с микродрами в периферической крови здоровых доноров (белые столбики) и больных описторхозом (черные столбики)

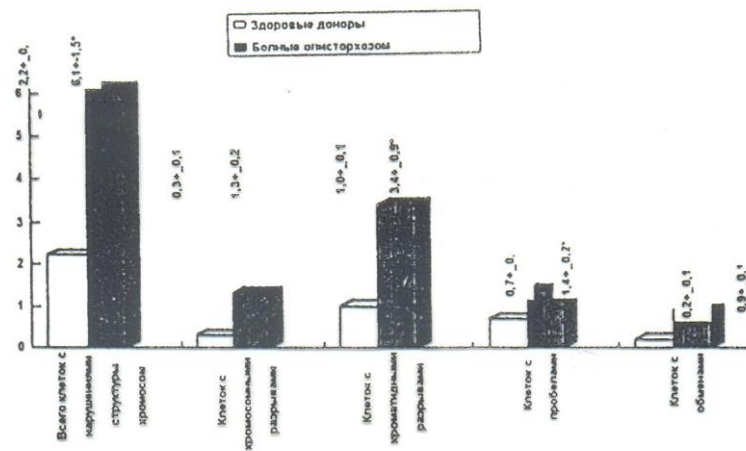
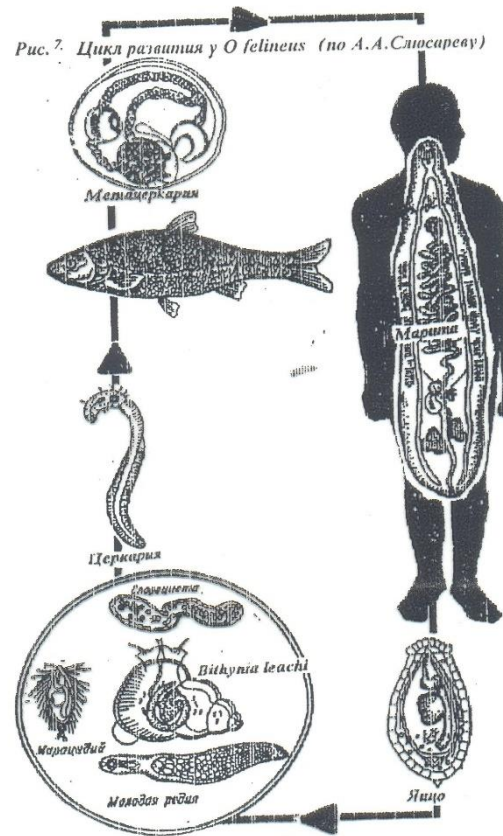


Рис. 16. Количество лимфоцитов с нарушениями структуры хромосом (%) у больных описторхозом

Рис. 7. Цикл развития у *O. felinus* (по А.А.Слюсареву)





Описторхоз

- Гельминтоз, поражающий преимущественно гепатобилиарную систему и поджелудочную железу;
 - Наиболее грозным осложнением описторхоза является малигнизация органов, заселяемых гельминтами;
 - Возбудители описторхоза: два вида печеночных сосальщиков, трематод семейства *Opisthorchiidae*: *Opisthorchis felinus* и *Opisthorchis viverrini*;
 - Чрезвычайно близкое по симптоматике заболевание, клонорхоз, вызывают печеночные сосальщики вида *Clonorchis sinensis*, также входящего в семейство *Opisthorchiidae*.
-



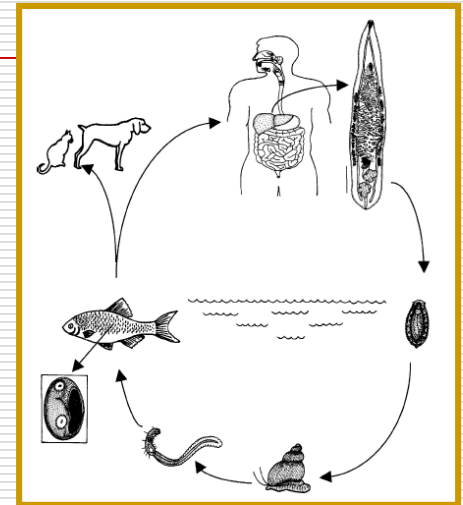
Печеночные сосальщики семейства *Opisthorchiidae*

- **Примитивно устроенные трехслойные животные**
- **Облигатные эндопаразиты**
- **Сложный жизненный цикл**

Таксономическое положение исследуемых ВИДОВ

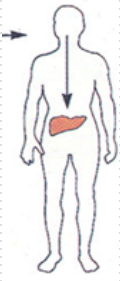
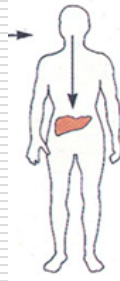
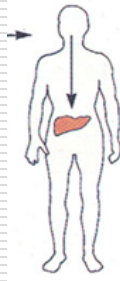
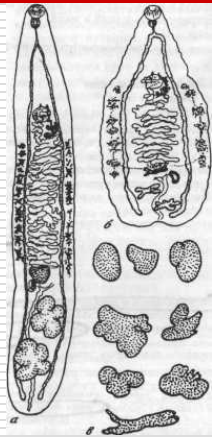
Тип *Platyhelminthes* (плоские черви),
класс *Trematoda* (сосальщики)
отряд *Opisthorchiidae*
семейство *Opisthorchiidae*

- п/сем *Opisthorchiinae*
 - род *Opisthorchis*
 - » *Opisthorchis felineus*
 - » *Opisthorchis viverrini*
 - род *Clonorchis*
 - » *Clonorchis sinensis*
- п/сем *Metorchinae*
 - род *Metorchis*
 - » *Metorchis bilis*
 - » *Metorchis xanthosomus*

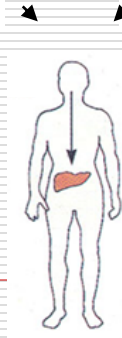
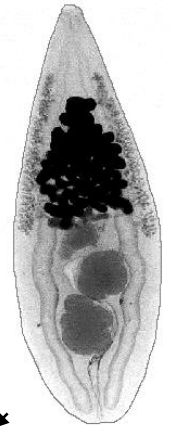
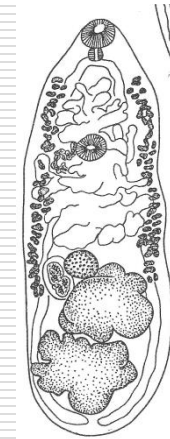


Печеночные сосальщики семейства Opisthorchiidae

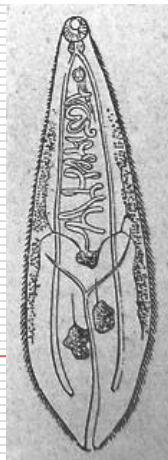
O. felinus *O. viverrini* *Clonorchis sinensis*



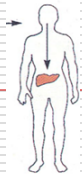
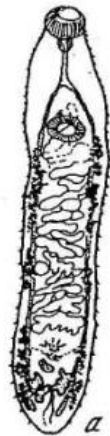
Metorchis bilis(albidus), M. conjuctus



O. noverca

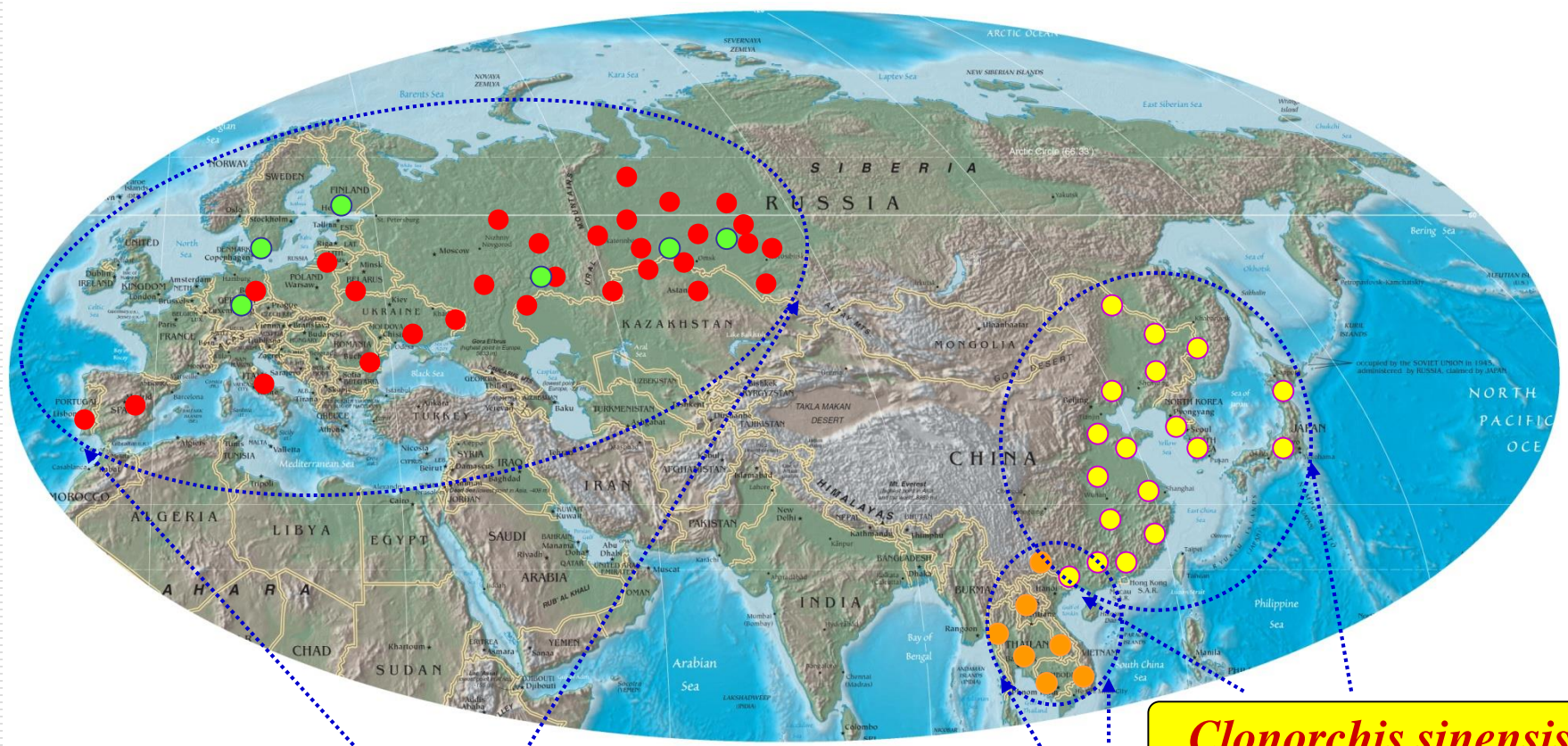


Amphimerus sp., Pseudamphistomum truncatum





Распространение описторхов, клонорхов и меторхов



Opisthorchis felineus

Metorchis bilis

Opisthorchis viverrini

Clonorchis sinensis

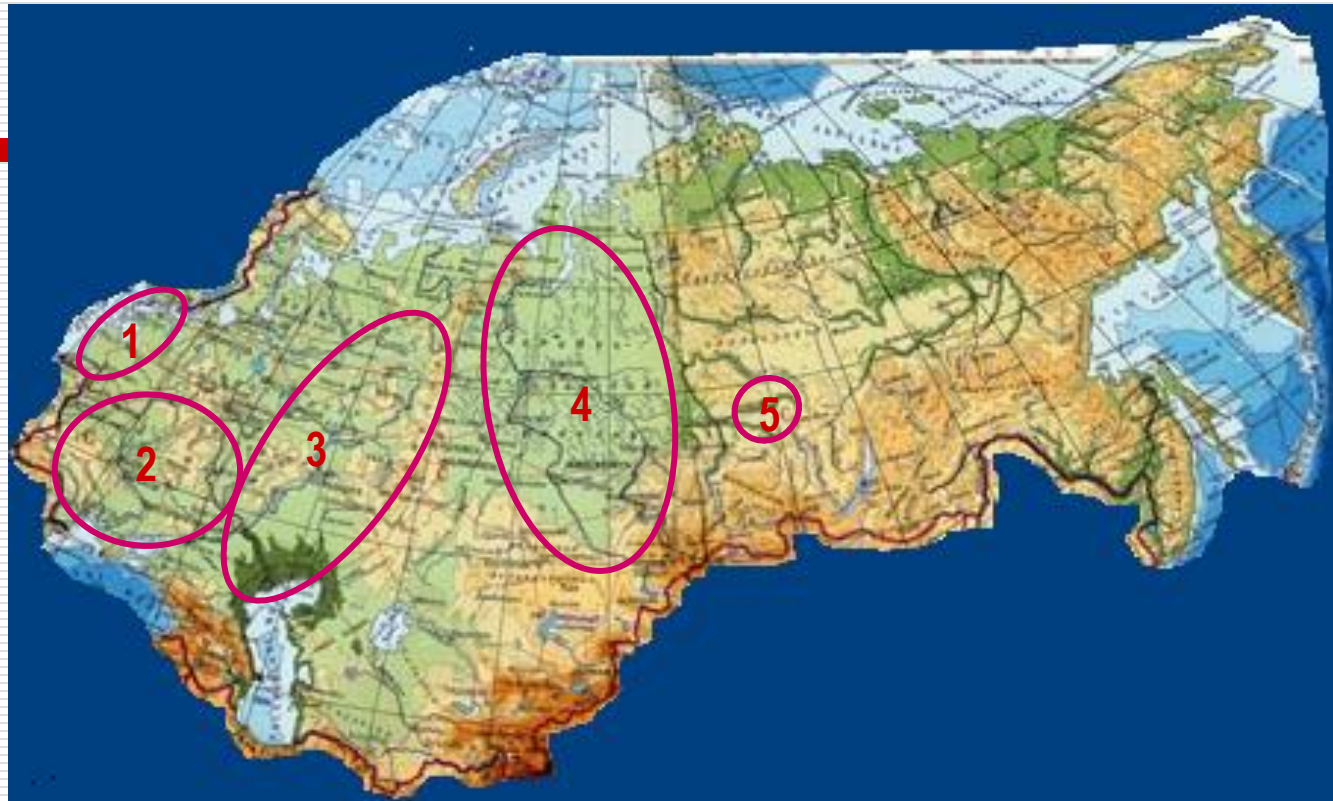


Краткая история *Opisthorchis felineus*

- 1884 ~~S. Rivolta описал *Distomum felineum* (sin. *Opisthorchis felineus*),~~
гельминтов, обнаруженных в желчевыводящей системе кошки
- 1891 Профессор Томского университета К.Н. Виноградов описал
гельминтов *Distomum sibiricum* (sin. *Opisthorchis felineus*),
заселяющих желчевыводящие пути человека
- 1895 R. Blanchard определил таксономическое положение *O. felineus*
- 1900 М. Askanazy опубликовал информацию паразитозах, вызванных
1904 *O. felineus*, у кошек и собак в Италии, Франции, Голландии,
Германии и России
- 1919 Академик К.И. Скрябин основал отечественную
1959 гельминтологическую науку, организовал системную работу по
выявлению и описанию очагов гельминтозов на территории
СССР, дал описание очагов описторхоза, ввел термин
«биогельминтоз»
- 1932 Профессор Н.Н. Плотников внес существенный вклад в
1973 исследование описторхоза в Сибири
-



Очаги описторхоза на территории СНГ



1 - Бассейн Балтийского моря, реки Неман и Западная Двина

2 - Бассейн Черного моря, реки Днепр, Дон и Днестр

3 - Бассейн Каспийского моря, реки Вога и Урал

4 – Арктический бассейн, реки Обь и Иртыш

5 – Арктический бассейн, река Бирюса

Жизненный цикл *Opisthorchis felinus*

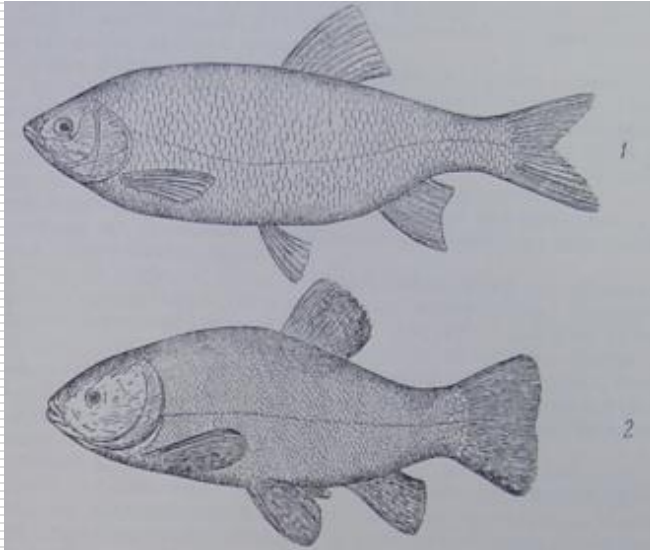




Заражение описторхами, клонорхами и меторхами

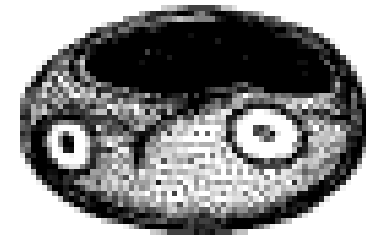
- Заражение людей происходит обычно при проглатывании личинок (метацеркарий) с продуктами питания;
- Рыбы – вторые промежуточные хозяева описторхов;
- Потенциальными носителями личинок возбудителя описторхоза *Opisthorchis felineus* являются следующие виды рыб семейства карповых: язь, елец, плотва, красноперка, лещ, голавль, синец, белоглазка, подуй, чехонь, жерех, линь, пескарь, гольян, верховка, шиповка, укляя, карась, сазан, толстолобик, чебак;
- Продолжительность жизни личинок всех трех видов описторхид может достигать 9 лет.

Рыбы – вторые промежуточные хозяева описторхид



Язь (*Idus idus*)

Линь (*Tinca tinca*)



Одними из основными переносчиков описторхов *Opisthorchis felineus* являются - язь (*Idus idus*), плотва (*Rutilus rutilus*), линь (*Tinca tinca*), усач (*Barbus fluviatilis*), лещ (*Abramis brama*).

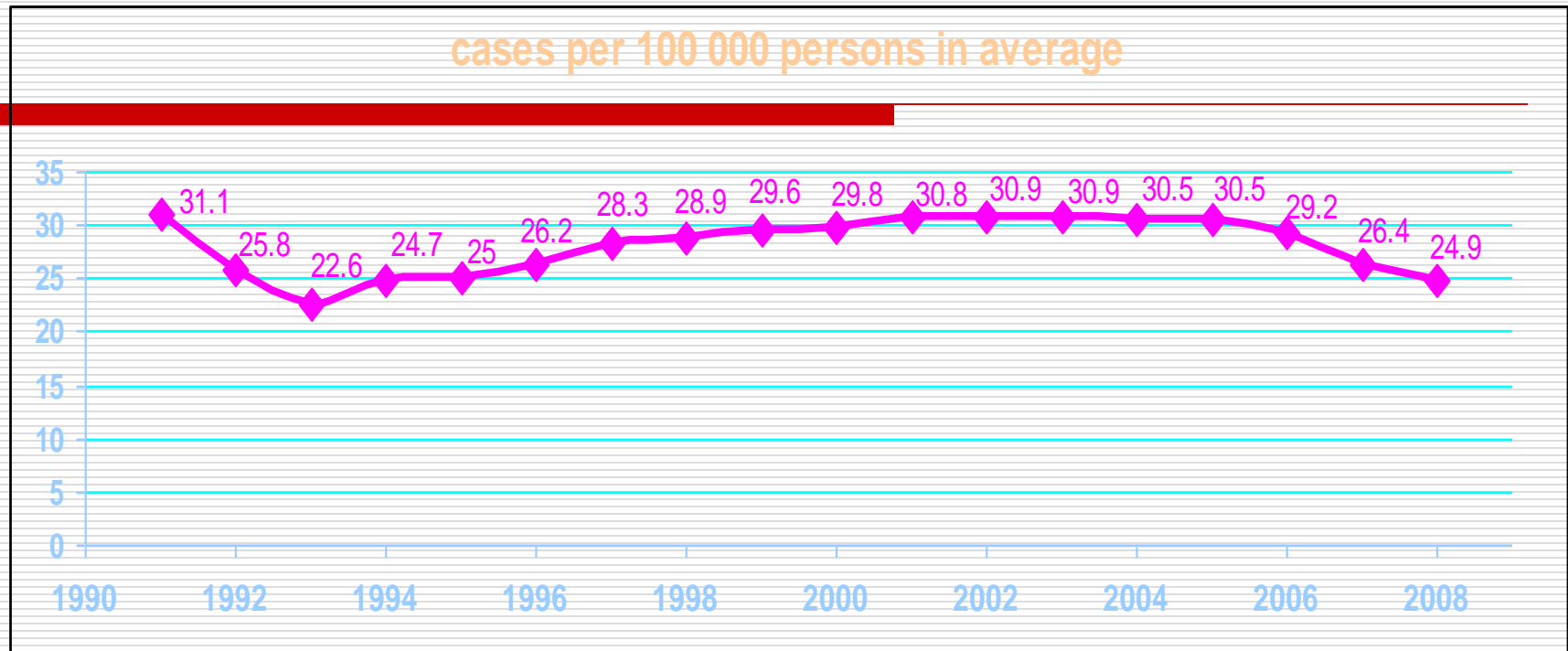
Метацеркарии располагаются в мышцах под кожей рыбы и окружены двухслойной цистой

Средний размер метацеркарий (мкм):

- *O. felineus* - 286 × 195
- *O. viverrini* - 201 × 167
- *C. sinensis* - 140 × 113



Динамика заболеваемости описторхозом в Российской Федерации



Эпидемиологические данные крайне противоречивы:

- Неофициально (Томская область) – инфицировано до 50% населения
- Официально (данные ведомства Онищенко по РФ) - 0.022 and 0.032%

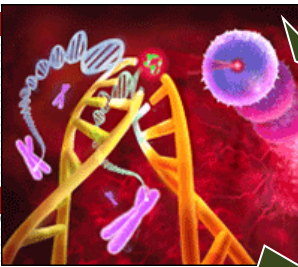


Печеночные сосальщики

Физическое воздействие

Имунопатология

Повреждение эпителия



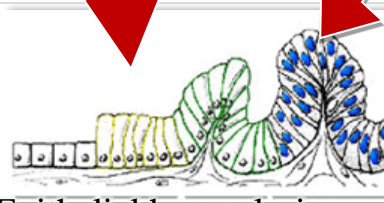
Повреждение ДНК

ROI
NO

Воспаление

Эндогенные нитрозамины

Фиброз

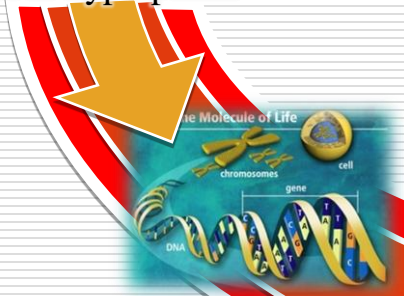


Epithelial hyperplasia
Goblet cell metaplasia
Adenomatous hyperplasia

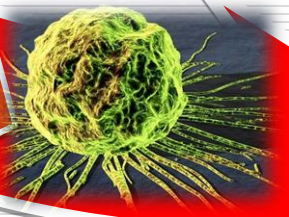


Экзогенные нитрозамины

Холестаз
Холангит



Накопление мутации



Злокачественная трансформация

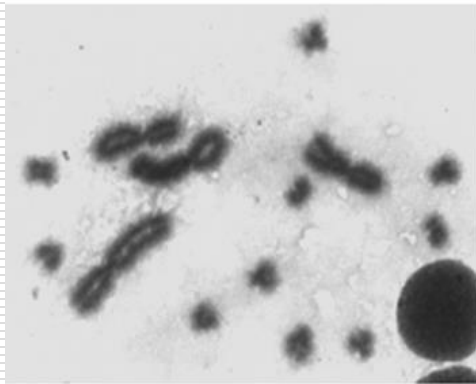


Холангиокарцинома

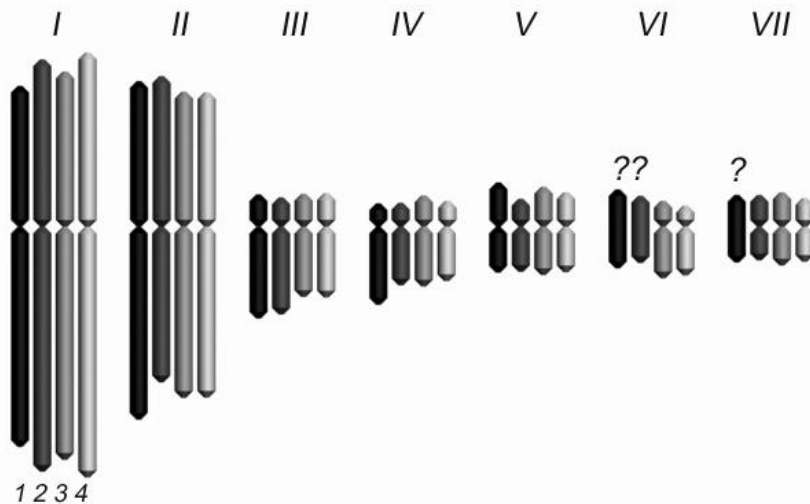
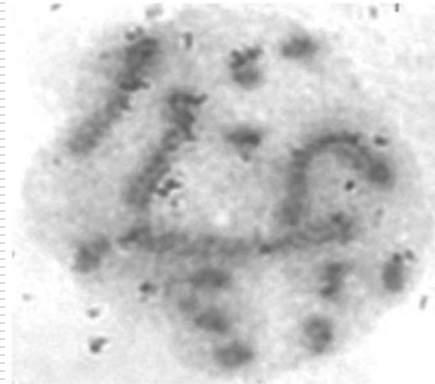
Кариология и цитогенетика описторхид

Кариотипирование образцов *O. felineus* из разных популяций Обь-Иртышского бассейна

Образец из Новосибирска



Образец из Томска

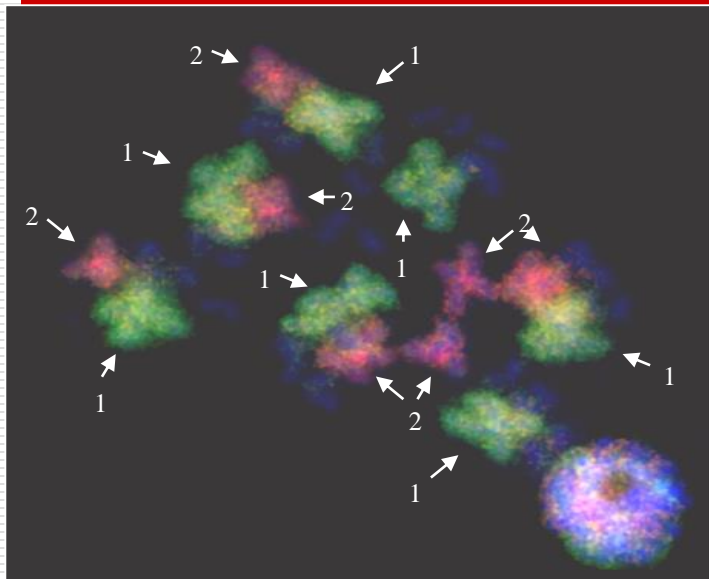


Относительные размеры и позиции центромер в кариотипах *O. felineus* по данным из опубликованных ранее и настоящей работы :

- 1) по данным Л.Н. Романенко, 1973 (образцы из Ханты-Мансийска) ;
- 2) по данным Я. Баршене, 1993 (образцы из Павлодарской обл.);
- 3) выборка из Новосибирской обл.;
- 4) выборка из Томской обл.

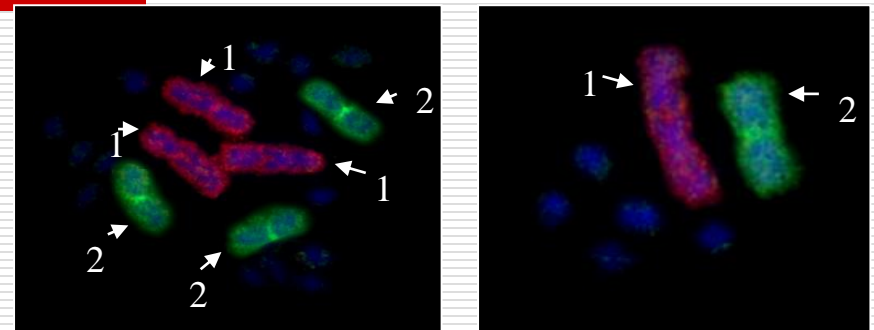
Кариология и цитогенетика описторхид

Opisthorchis felineus

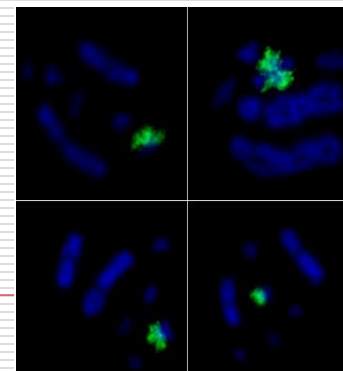


FISH ДНК-проб, специфичных хромосомам 1 и 2 *O. felineus*, с хромосомами *O. felineus*.
Стрелками указаны хромосомы 1 (FITC) и 2 (Cy3).

Metorchis xanthosomus



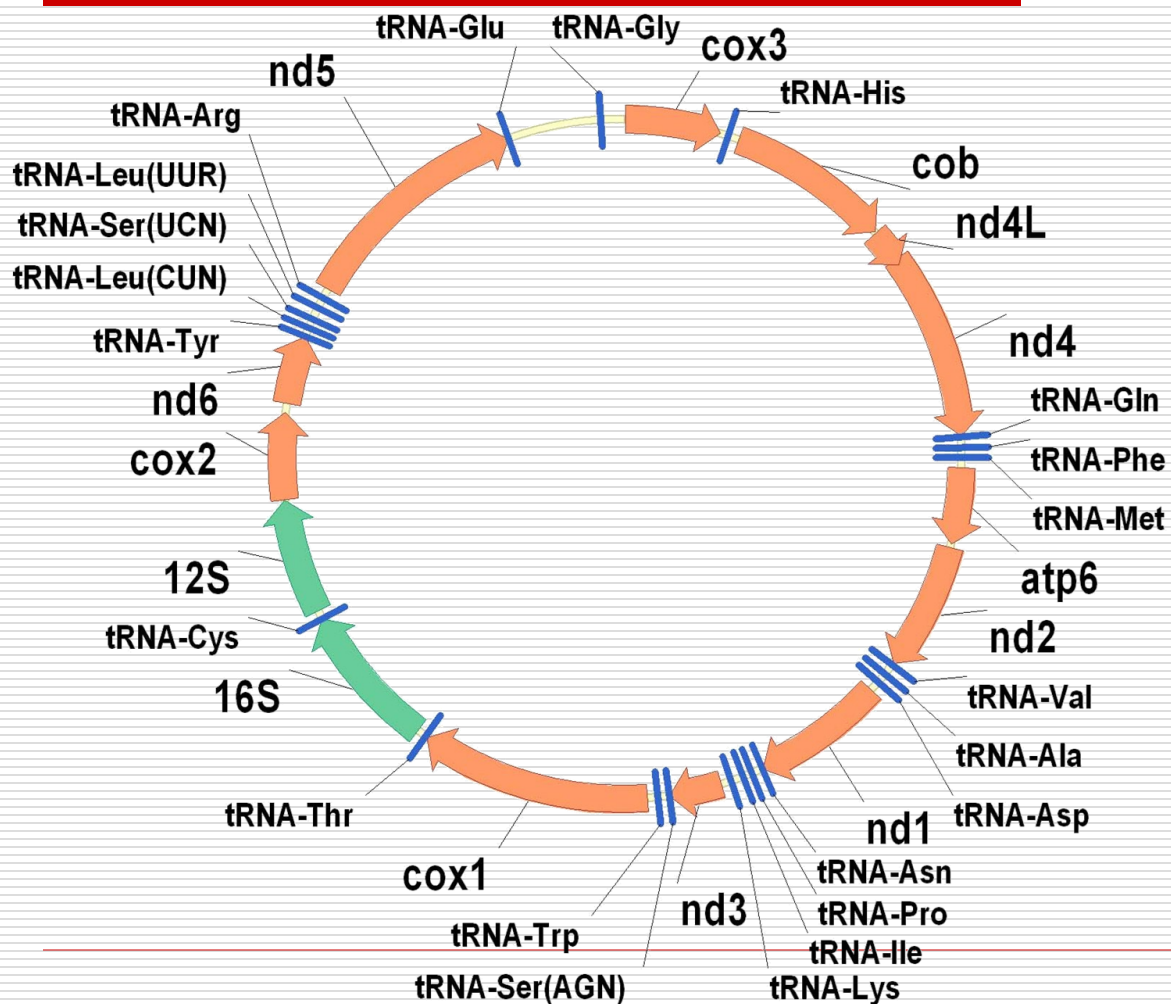
FISH ДНК-проб, специфичных хромосомам 1 и 2 *M. xanthosomus*, с хромосомами *M. xanthosomus*.
Стрелками указаны хромосомы 1 (Cy3) и 2 (FITC).



FISH с пробой 18S rDNA



Схема строения мтДНК *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*



- **12 белок-кодирующих генов (отсутствует ген *atp8*)**
- **2 гена рРНК**
- **22 гена тРНК**

Некодирующие регионы мтДНК *F. hepatica*, *O. felineus* и *C. sinensis*

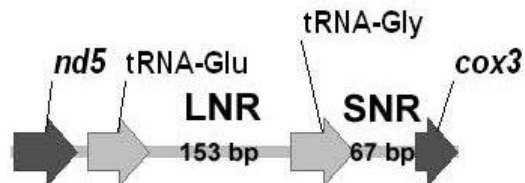
F. hepatica



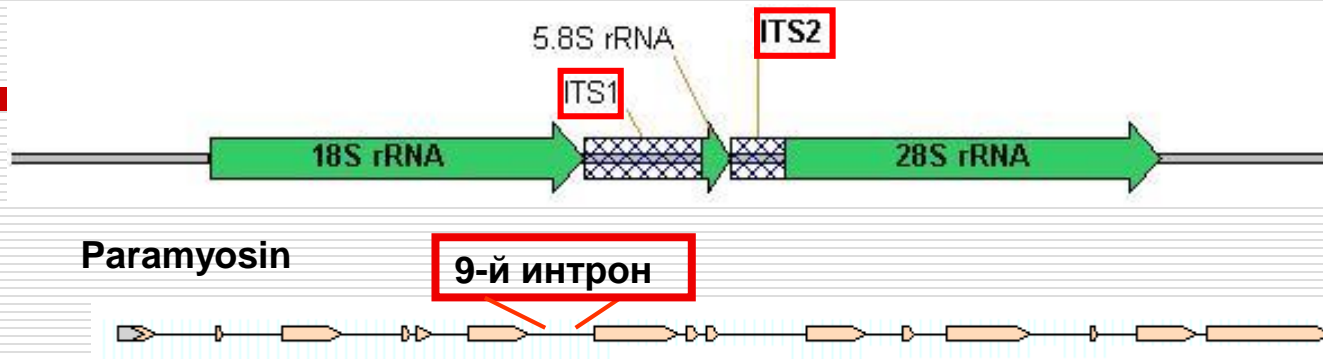
O. felineus



C. sinensis

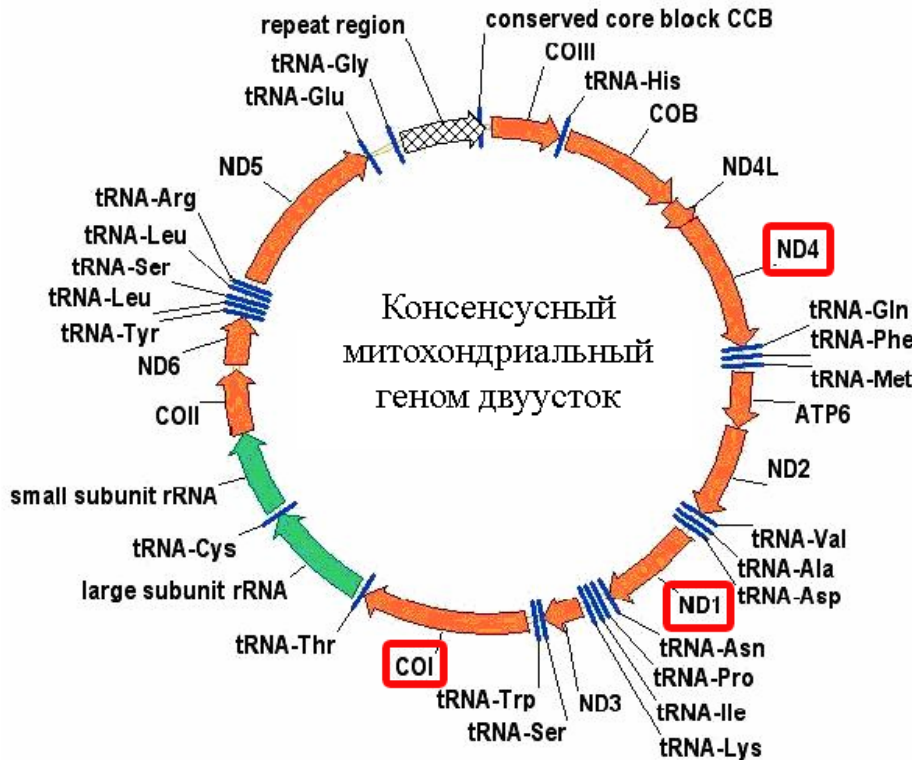


Ядерные и митохондриальные маркеры для ДНК-типирования описторхид



Ядерные маркеры:

ITS1 (internal transcribed spacer 1);
 ITS2 (internal transcribed spacer 2);
 Pmi9 (9-й интрон гена парамиозина)



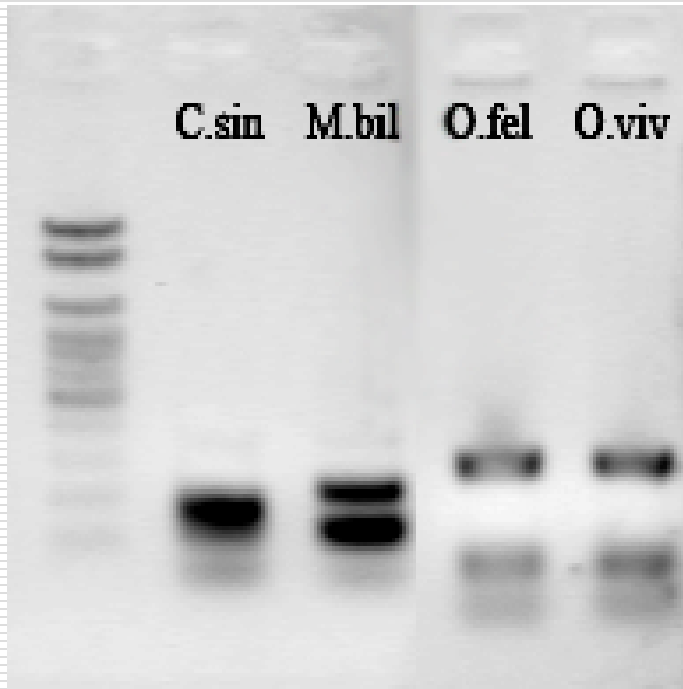
Митохондриальные маркеры:

cox1 (cytochrome oxidase 1);
 cox2 (cytochrome oxidase 2);
 cox3 (cytochrome oxidase 3);
 ND1 (NADH dehydrogenase 1);
 ND4 (NADH dehydrogenase 4).



Разработка методов видовой ДНК-идентификации описторхид

Выявленное межвидовое разнообразие по маркеру *ITS2* было положено в основу метода ДНК-идентификации видов описторхид



Результаты ПДФФ-ПЦР
(универсальные праймеры и
дифференциальная рестрикция
ампликонов) для 4-х видов
описторхид



ГЕНОМНЫЕ ПРОЕКТЫ ТРЕМАТОД

Eukaryotic Ongoing Genome Projects

	Вид трематод	Тип проект	Организация-исполнитель
1	<i>Clonorchis sinensis</i>	Геном	Seoul National Univ
2	<i>Fasciola hepatica</i>	EST	Sanger Institute
3	<i>Schistosoma</i>	Геном	WHO; UNDP World Bank Schistosoma Genome Network
4	<i>Schistosoma haematobium</i>	EST	Sanger Institute
5	<i>Schistosoma japonicum</i>	EST	Chinese National Human Genome Center at Shanghai Institute of Parasitic Diseases
6	<i>Schistosoma mansoni</i>	EST	ONSA
7	<i>Schistosoma mansoni</i> Puerto Rican	Геном	TIGR Sanger Institute

<http://www.genomesonline.org/gold.cgi?want=Eukaryotic+Ongoing+Genomes>