

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

ENDOSIMIOZA U TREPETLIKAŠA  
ENDOSYMBIOSIS IN CILIATES  
SEMINARSKI RAD

Daria Kranželić

Preddiplomski studij biologije

(Undergraduate Study of Biology)

Mentor: izv. prof. dr. sc. Renata Matoničkin Kepčija

Zagreb, 2016.

# SADRŽAJ:

1. UVOD .....	3
2. TREPETLJIKAI.....	3
2.1. Obilježja .....	3
2.2. Raznolikost.....	4
3. ENDOSIMBIOZA.....	4
4. ENDOSIMBIOZA TREPETLJIKAI.....	6
4.1. Povijest .....	6
4.2. Endosimbioza između rodova <i>Paramecium</i> i <i>Holospora</i> .....	6
4.3. Endosimbioza između <i>Paramecium bursaria</i> i roda <i>Chlorella</i> .....	9
5. LITERATURA .....	11
6. SAŽETAK.....	11
7. SUMMARY .....	12

# 1. UVOD

Endosimbioza je vrlo važan faktor u evoluciji eukariotskih stanica, budući da su se na taj način razvili pojedini organeli specifični za eukariote. Međutim, molekularni mehanizmi vezani uz pojavu endosimbioze nisu u potpunosti poznati. Priliku za detaljnije istraživanje i upoznavanje detalja endosimbioze nam pružaju trepetljikaši koji imaju endosimbionte. Kod nekih trepetljikaša je moguće uspostaviti endosimbiozu između simbionta i domaćina koji nema simbiont. Iz tog razloga, možemo pronaći modelne organizme za proučavanje endosimbioze u trepetljikaša.

## 2. TREPETLJIKAŠI

### 2.1. Obilježja

Trepetljikaši (Ciliophora) su skupina praživotinja monofiletskog podrijetla. Većinom su asimetrični organizmi koji su raspostranjeni u slatkim vodama, u moru i u tankom sloju vode oko čestica tla. Nespolno se razmnožavaju binarnom diobom i pupanjem, a spolno konjugacijom koja je specifičan način razmnožavanja. Tipična obilježja trepetljikaša uz brojne trepetiljke su i građa korteksa i jezgri dimorfizam (Habdija i sur., 2011.).

Korteks služi za održavanje stalnog oblika tijela trepetljikaša. Sagrađen je od dvije komponente: pelikula i infracilijatura. Pelikuli pripadaju stanična membrana i sustav alveola, a osnovna dijelovi infracilijature su kinetidi. Kinetidi sadrže bazalno rijelo iz kojeg izlaze trepetiljke. Korteks se može podijeliti na dva dijela: tjelesno i oralno područje.

Trepetljikaši mogu biti predatori, herbivori, bakteriovorci ili detritivori. U području citofarinksa se nalaze snopovi štapićastih mikrotubula ili složeniji cilijarni organeli. Hrana se razgrađuje u probavnim mjehurićima, a neprobavljeni ostaci se izbacuju kroz citoprokt.

Posebnost kod trepetljikaša se heterokariotne jezgre. Postoji najmanje jedan markonukleus i najmanje jedan mikronukleus. Diploidni mikronukleusi su odgovorni za genetičku rekombinaciju, a poliploidni makronukleusi za stanični metabolizam.

Specifičnost trepetljikaša je i konjugacija kod koje dolazi do djelomične fuzije kompletarnih stanica gdje se razmjenjuju haploidne jezgre nastale od mikronukleusa. Time organizmi mogu dobiti nove genetičke informacije koje mogu pomoći u preživljavanju.

## 2.2. Raznolikost

Opisano je više od 8 000 vrsta trepetljikaša koji su raspoređeni prema strukturalnoj građi korteksa. Podjeljeni su u nekoliko razreda među kojima su Karyorelictea, Heterotrichea, Spirotrichea, Litostomatea, Phyllopharyngea i Oligohymenophorea (Habdija i sur., 2011.).

Razred Oligohymenophorea je najrasprostranjenija i najbolje istražena skupina trepetljikaša. Ime je dobila po prisutnosti nekoliko oralnih polikinetida s lijeve strane usne aparature. Citosom je smješten na dnu udubljenja stanične površine. Razred je podijeljen u nekoliko redova: Penicula, Hymenostomatia i Peritrichia.

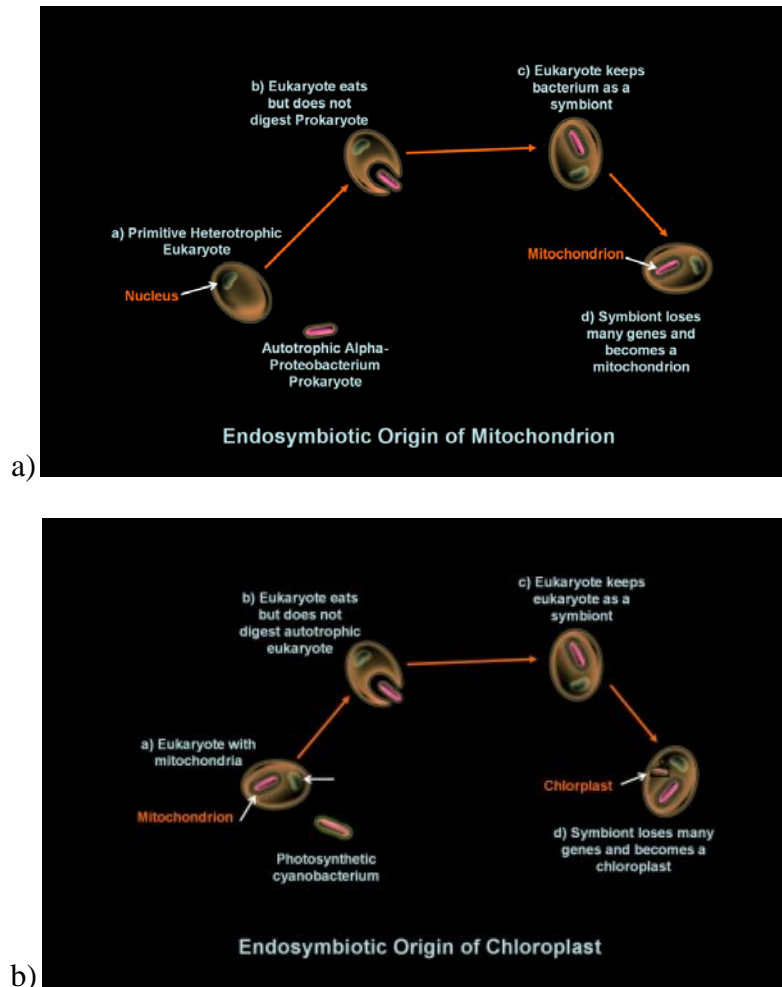
U podrazred Peniculia spada rod *Paramecium* u koji spadaju vrste koje nam služe kao modelni organizmi za primarnu i sekundarnu endosimbiozu. Oni su nam podobni modelni organizmi jer se proces endosimbioze može promatrati pod svjetlosim mikroskopom i može se izazvati.

## 3. ENDOSIMBIOZA

Teorijom endosimbioze se pokušava objasniti kako su se eukarioti razvili iz prokariota. Znanstvenica Lynn Margulis je sredinom 20. stoljeća postavila teoriju o endosimbiozi koja je s razvojem istraživačkih metoda sve više prihvaćena.

Simbioza je „trajna ili privremena životna zajednica dvaju organizama različitih vrsta, od koje članovi imaju korist ili štetu“ (<http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=55995>). Kao su se te zajednice sve više povezivale, simbionti su sve više zavisili jedan o drugome te bi se odvajanjem simbionata izazvala smrt. Takva ovisnost jednog organizma o drugom je poslužila kao jedan od najvažnijih elemenata evolucije organela. Smatra se da se uspostavljanje endosimbioze odvijalo u nekoliko koraka (Slika 1.). Prvi korak je bio kada je primitivna eukariotska stanica mogla fagocitirati prokariotsku stanicu. Sljedeći korak se dogodio kada eukariotska stanica nije probavila fagocitiranu eukariotsku stanicu. Tada je počelo stvaranje simbiotske veze gdje je eukariot pružao zaštitu i nutrijente, a prokariot dodatnu energiju. Posljedni korak je bio kada je simbiont izgubio neke gene koji su mu bili neophodni za život te mu je domaćin preuzeo potrebne gene. Dokazi ukazuju da su se od autotrofne bakterije Alphaproteobacteria koja se služi fotosintezom za proizvodnju energije razvili mitohondriji, a kloroplasti od cijanobakterije (<http://www.fossilmuseum.net/Evolution/Endosymbiosis.htm>). Takvu

simbioza se naziva primarna simbioza i označava odnos između eukaritske stanice kao domadara i prokariotske stanice kao simbionta.



**Slika 1.** Teorija endosimbize, pod primjerom a) prikazano je nastajanje mitohondrija, a pod b) kloroplasta (Slika pruzeta iz <http://www.fossilmuseum.net/Evolution/Endosymbiosis.htm> )

Postoji i sekundarna endosimbioza kod koje organizam s primarnom endosimbiozom u simbiotski odnos uzima slobodno živi eukariot. Ona se dogodila nekoliko puta u evoluciji i doprinjela je raznolikosti algi i drugih eukariotskih organizmima. Također je poznata i tercijarna endosimbioza gdje slobodno živi eukariot bez plastida u simbiotski odnos uzima eukariotski organizam sa sekundarnim endosimbiontom.

Neki od dokaza koji podupiru primarnu endosimbiozu su: sličnost u veličini između bakterija i mitohondrija te kloroplasta, membrana, njihove DNA, RNA i ribosomi su slični bakterijskom (<http://www.fossilmuseum.net/Evolution/Endosymbiosis.htm>).

## 4. ENDOSIMBIOZA TREPETLJIKASA

### 4.1. Povijest

Waldemar Hafkine je 1890. godine po prvi puta opisao bakterije u trepetljikaša roda *Paramecium*. On je tada formirao rod *Holospora* s tada poznate tri vrste: *Holospora obtusa*, *H. elegans* i *H. undulata*, koje su pronađene u jezgri vrste *Paramecium caudatum* (Görtz, 2014.). Sljedećih destaka godina otkriveno je mnogo novih vrsta, ali zbog nedovoljno razvijene tehnologije i toga što se simbioanti nisu mogli uzgajati izvan domaćina, daljnja istraživanja nisu bila moguća. Prema morfološkim osobinama pokušale su se razlučiti filogenetske linije. Tada su se najviše proučavali ultrastrukturni aspekti, infekcije i aktivnost ubijanja domaćina.

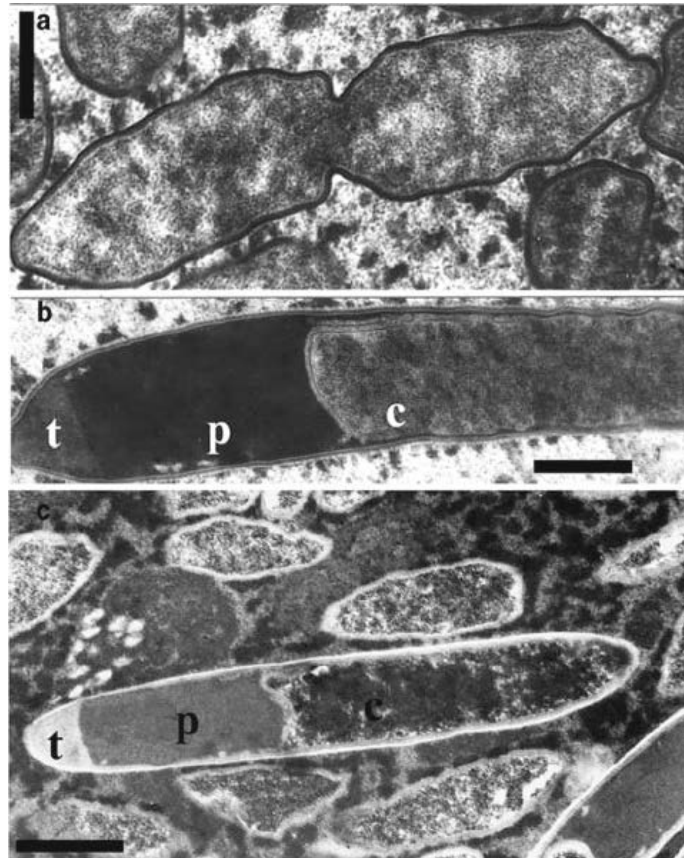
Razvitkom elektroničkog transmisijskog mikroskopa mogle su se bolje proučavati manje strukture i komunikaciju između simbioanta i domaćina. To je pružilo detaljnije opise koji su ukazivali na filogenetske odnose, ali to nije bilo dovoljno za filogenetsku klasifikaciju. Razvitkom molekularne biologije postavile su se prve karte genoma, kojima se dokazalo da su simbioanti bakterijskog podrijetla. Razvile su se nove metode kao identifikacija i lokalizacija proteina sa monoklonskim antitijelima za istraživanje endosimbioze koje su se i kasnije koristile za različita istraživanja (Görtz, 2014.).

U 1991. godini se razvila nova metoda „full-cycle rRNA approach“ koja je poslužila za klasifikaciju endosimbionata i drugih protista. Klasifikacija prema rRNA genima nije se uvijek pokazala kao dostatna kod svih slučajeva, ali je to bio veliki korak za filogeniju. Kada je bilo moguće sekvencionirati genome iz mali masa, genomi simbioanta su bili poznati. To je omogućilo stvaranje filogenetskog stabla koje je bilo pouzdano. Usprkos razvijenim novim metodama, mnogo stvari još nije poznato i znanstvenici se susreću s problemima. Endosimbionti koji se duže razdoblje uzgajaju u laboratoriju se izgube jer se, zbog brzog rasta domaćina, koncentracija simbioanta razrijedi i nakraju i izgubi.

### 4.2. Endosimbioza između rodova *Paramecium* i *Holospora*

U rodu *Holospora* postoji devet vrsta i pripadaju razredu Alphaproteobacteria. Oni ne mogu rasti izvan stanice domadara, nego samo zadržavaju svoju ifektivnost nekoliko dana da zaraze nove domaćine. Potoji dva morfološka oblika tijekom njihovog životnog ciklusa:

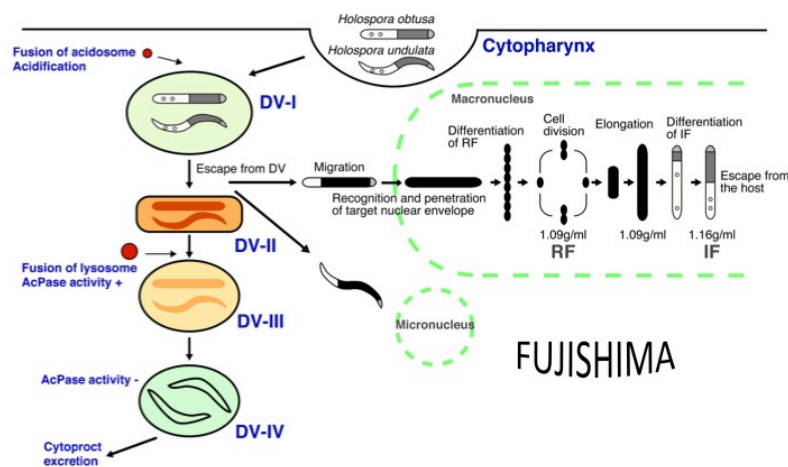
kratki reproduktivni oblik (RF) i dugi infektivni oblik (IF) (Slika 2.). Bakterija u domaćinu postoji u RF obliku i dijeli se binarnom diobom u jezgri domaćina kada se on isto dijeli binarnom diobom. Kada domaćin gladuje, RF se prestaje dijeliti i aktivira se prelazak RF u IF. Također, kada se domaćin tretira emetinom koji inhibira sintezu proteina, isto se aktivira diferencijacija. Takvi rezultati sugeriraju da binarna dioba RF oblika treba jezgrene proteine domaćina za rast i da kada se potroše ti proteini prestaje binarna dioba RF oblika i inducira se diferencijacija u IF oblik (Fujishima i sur., 2014.).



**Slika 2.** Infektivni i reproduktivni oblici roda *Holoospora*: a reproduktivni oblik i b infektivni oblik *H. bacillata* u *P. nephridiatum*. c populacija vrste *Holoospora* sp. (preuzeto iz [https://www.researchgate.net/figure/225361029\\_fig2\\_Fig-4-Infectious-and-reproductive-forms-of-different-holosporas-a-Reproductive-forms](https://www.researchgate.net/figure/225361029_fig2_Fig-4-Infectious-and-reproductive-forms-of-different-holosporas-a-Reproductive-forms))

Kada infektivne forme IF budu pojedene i obuhvaćene probavnim vakuolama (DV) one pobjegnu iz kiselog okoliša u citoplazmu prije nego što ih enzimi uspiju razgraditi. Tada IF oblik migrira do ciljne jezgre i prepoznaje metu prema lipidopolisaharidima u membrani. On ulazi u nukleus tako što mu je penetracijski vrh vodeći. U nukleusu raste i počne se diferencirati u RF oblik. On se binarno dijeli sve dok domaćin raste, a kada domaćin gladuje

RF se produžuje i diferencira u IF oblik te kada se makronukleus ispuni IF oblicima domaćin ne može više rasti i bude ubijen. Tako bakterije mogu zaraziti novog domaćina (Slika 3.).



**Slika 3.** Proces infekcije i životni ciklus vrste *Holospora undulata* (preuzeto iz [https://www.researchgate.net/figure/225361029\\_fig2\\_Fig-4-Infectious-and-reproductive-forms-of-different-holosporas-a-Reproductive-forms](https://www.researchgate.net/figure/225361029_fig2_Fig-4-Infectious-and-reproductive-forms-of-different-holosporas-a-Reproductive-forms))

Izolacija simbionata je jako dugo predstavljala problem jer ne mogu preživjeti izvan stanice domaćina. Prvi puta je to uspjelo iz makronukleusa vrste *Paremecium biaurelia* ECTEOLA metodom (Fujishima i sur., 2014.). Može se izolirati još koristeći se Petcoll gradijentskom centrifugom jer postoji razlika u gustoći između RF i IF oblika zbog različite veličine. Simbionti se mogu očuvati kriozmrzavanjem kod kojeg se ne izgubi sposobnost reprodukcije.

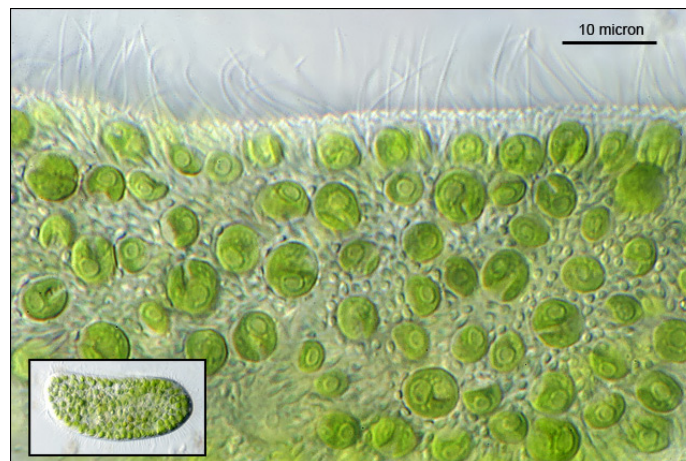
Vrste iz roda *Holospora* su jedini organizmi do sada koji mogu razlikovati mikronukleus i makronukleus. Jedinke imaju u penetracijskom vrhu posebne proteine koji se vežu na vanjsku membranu nukleusa te ih tako prepoznaju.

*Holospora* vrste nemaju pozitívni učinak na rast domaćina nego inhibiraju rast domaćina i nakraju ga ubiju. S druge strane, može pružiti rezistenciju na toplinu i promjene u osmolarnosti tako što djeluje na ekspresiju gena. Zbog mogućnosti mijenjanja ekspresije gena ovaj par simbionata je dobar model za istraživanja primarne endosibioze.



### 4.3. Endosimbioza između *Paramecium bursaria* i roda *Chlorella*

*Paramecium bursaria* može u svojoj citoplazmi sadržavati nekoliko stotina endosimbiotskih algi roda *Chlorella* (Slika 4.). One imaju mutualistički odnos jer domaćin opskrbljuje alge s dušikovim komponentima i CO<sub>2</sub> te ih štiti od virusa. Alge snabdijevaju domaćina s maltozom, produktom fotosinteze. Stopa produktivnosti fotosinteze je viša kada su alge u simbiozi nego izolirane. Zbog toga jedinke *P. bursaria* koje imaju endosimbiote mogu više narasti nego bez nje. Zbog fotosintetske aktivnosti cikardijski ritmovi su im jako slični te se poklapa vrijeme binarne diobe. Alge iz domaćina se mogu ukloniti rastom u tami, radijacijom X-zrakama, tretiranjem inhibitorima fotosinteze ili tretiranjem herbicidima. *P. bursaria* i alge mogu živjeti odvojeno i može se miješanjem ponovo uspostaviti endosimbioza. Zbog navedenih razloga oni su savršeni modelni organizmi za proučavanje evolucije eukariota kroz uspostavljanje sekundarne endosimbioze (Fujishima i sur., 2014.).



**Slika 4.** Endosimbioza algi roda *Chlorella* i vrste *P. Bursaria* ( preuzeto iz:

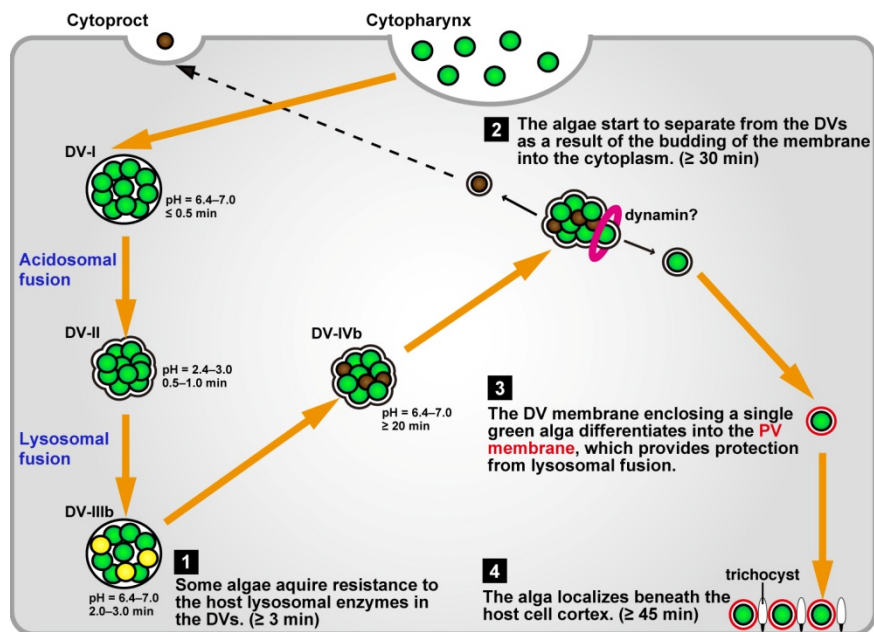
<http://www.photomacrography1.net/forum/viewtopic.php?p=5494&sid=c6ab0ce81730f57842f0b2761c2c0efd>)

U vrsti *P. bursaria* postoje tri vrste algi koje mogu uspostaviti endosimbiozu: *C. vulgaris*, *C. sorokiniana* i *Parachlorella kessleri*. Postoje i druge alge roda *Chlorella* koje nemaju sposobnost infekcije, a koje mogu izaći iz DV-a, ali se ne mogu lokalizirati ispod jezgre i one budu probavljene ili izbačene iz stanice.

Kod uspostavljanja endosimbioze, postoji nekoliko faza kroz koje prolaze probavne vakuole (DV) koje su definirane po morfološkim struktukama npr. boje algi u njemu. DV-I imaju okruglu membranu i zelene alge. DV-II su manje pa se zbog toga membrana ne može vidjeti pod kontrastnim mikroskopom i imaju zelene alge. DV-III boja algi je bezbojna i

veličina se povećala pa se membrana sada može vidjeti pod mikroskopom. Kod posljednje faze DV-IV alge su zelene ili smeđe, a veličina se ponovo smanjila što čini membranu jedva vidljivom pod mikroskopom.

Uspostavljanje endosimbioze se odvija u 4 koraka. Prvi korak je postizanje rezistencije na probavne enzime u DV-u domaćina. To zavisi o aktivnosti fotosinteze, primjerice alge koje su uzgajane 24 sata u mraku su bile probavljene. U drugom koraku alge počinju izlaziti iz probavne vakuole koja se nalazi u fazi četiri kao rezultat pupanja membrane u citoplazmu. U trećem koraku pojedinačne alge koje su izašle iz DV-a koje su okružene njihovom membranom se diferenciraju u perialgalnu vakuolu (PV). U posljednjem koraku alga obavijena PV membranom putuje ispod jezgre donaćina gdje se veže na mitohondrije i trihociste (strukture u blizini jezgre domaćina koje se koncentriraju u zonama gdje nema primarnih lizosoma). Smatra se da se vežu na njih kao bi sprječili fuziju sa lizosomina jer PV membrana ne može zaštititi od fuzije.



**Slika 5.** Proces uspostavljanja endosimbioze (preuzeto iz: [https://accaff.jp/fujishima\\_lab/](https://accaff.jp/fujishima_lab/))

Danas su poznate samo kvalitativne razlike između DV i PV membrana, ali ne i razlike u sadržaju. PV membrane okružuju samo jednu stanicu alge, teško se promatraju pod mikroskopom, vežu se na mitohondrije, dok se DV ne veže. Potrebne su opsežnije i detaljnije metode za istraživanje proteina membrani kao bi se otkrila razlika između DV i PV membrane (Fujishima i sur., 2014.).

## 5. LITERATURA

Görtz: Prokaryotic endosymbionts in ciliates, U: Cilia and Flagella - Ciliates and Flagellates, ur: K. Hausmann, R. Radek, Schweizerbart Science Publishers Stuttgart, 2014, str. 203-228

Fujishima, Kodama: Insights into *the Paramecium-Holospira* and *Paramecium-Chorella* Symbioses, U: Cilia and Flagella - Ciliates and Flagellates, UR: K. Hausmann, R. Radek, Schweizerbart Science Publishers Stuttgart, 2014, str. 229-238

Habdija, Primc Habdija, Radanović, Špoljar, Matoničkin Kepčija, Vujčić Karlo, Miliša, Ostojić, Sertić Perić: Protista-Protozoa Metazoa-Invertrebata, Alfa, 2011., str.51-60

[https://accaff.jp/fujishima\\_lab/](https://accaff.jp/fujishima_lab/)

[https://accaff.jp/fujishima\\_lab/index.php?FrontPage](https://accaff.jp/fujishima_lab/index.php?FrontPage)

[www.fossilmuseum.net/Evolution/Endosymbiosis.htm](http://www.fossilmuseum.net/Evolution/Endosymbiosis.htm)

[https://www.researchgate.net/figure/225361029\\_fig2\\_Fig-4-Infectious-and-reproductive-forms-of-different-holosporas-a-Reproductive-forms](https://www.researchgate.net/figure/225361029_fig2_Fig-4-Infectious-and-reproductive-forms-of-different-holosporas-a-Reproductive-forms)

<http://www.photomacrography1.net/forum/viewtopic.php?p=5494&sid=c6ab0ce81730f57842f0b2761c2c0efd>

## 6. SAŽETAK

Endosimbioza je jedan od najvažnijih evolucijskih koraka u razvoju eukariotske stanice. Ona nam objašnjava kao su se razvili organeli poput mitohonrija i koloroplasta. Nakon postavljanja teorije nije bilo puno saznanja kako je došlo do endosimbioze i kakav odnos imaju domaćin i simbiot. Kako bi se razjasnili mehanizmi endosimbioze bili su potrebni prikladni modelni organizmi. Takvi su rod trepetljikaša *Paramecium* i njegovi simbionti. Endosimbioza s rodom *Holospira* daje uvid u to kako se odvijala primarna endosimbioza, a endosimbioza s rodom *Chlorella* u mehanizme sekundarne endosimbioze.

U ovom radu smo pobliže upoznali proces endosimbioze u trepetljikaša koji nam pruža u uvid u moguće mehanizme evolucije eukariota. Za daljna istraživanja endosimbioze su potrebne nove metode kako bi se detaljnije razriješio misterij nastanka eukariota.

## 7. SUMMARY

Endosymbiosis is one of the most important evolutionary step in the development of a eukaryotic cell. This theory explains the origin of organelles like mitochondria and chloroplasts. After setting up the theory there wasn't a lot of knowledge on how endosymbiosis occurred and what kind of relationship exists within the host and symbiont. In order to clarify the mechanisms of endosymbiosis there was a need for suitable model organisms. One of them is ciliate genus *Paramecium* and its symbionts. Endosymbiosis with *Holospira* species offer us a view on primary endosymbiosis, and endosymbiosis with *Chlorella* species could clarify secondary endosymbiosis.

In this article we took a closer look on the process of endosymbiosis in ciliates, which provides us with the insight into possible mechanisms of eukaryote evolution. For further research of endosymbiosis, new methods are needed in order to fully resolve the mystery of the emergence of eukaryotes.