

STYLONYCHIA LEMNAE — МОДЕЛЬНЫЙ ОБЪЕКТ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МИНИХРОМОСОМ МАКРОНУКЛЕУСА ИНФУЗОРИЙ

© А. Ю. Пименов, И. Б. Райхель, И. Н. Сковородкин, Ю. И. Подлипаева,
Д. Аммерманн, С. О. Скарлато¹

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹ электронный адрес: sergei_skarlato@yahoo.com

В обзоре на примере *Stylonychia lemnae* дается представление об уникальной структурно-функциональной организации генома макронуклеуса (соматического ядра) инфузорий-спиротрих. Обобщены данные, касающиеся строения ядерного аппарата *S. lemnae* в интерфазе, в процессе вегетативного деления клетки, а также во время и после полового процесса инфузорий — конъюгации или автогамии. Особое внимание уделено описанию структуры и функций мини-хромосом макронуклеуса *S. lemnae*, включая кодирующие участки, 5'- и 3'-нетранслируемые участки и короткие теломеры. Обосновывается гипотеза, согласно которой теломеры спиротрих представляют собой участки мини-хромосом, в которых локализуется точка начала репликации. Обсуждаются экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что 5'-нетранскрибируемые области мини-хромосом, несущих гены $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -тубулина, содержат по крайней мере несколько классических элементов эукариотного промотора: ТАТА-бокс, СААТ-бокс и инициатор транскрипции. Существование в минихромосомах специфических для спиротрих регуляторных последовательностей, контролирующих репликацию и транскрипцию, не подтвердилось.

Ключевые слова: инфузории, макронуклеус, мини-хромосомы низших эукариот, ядерный аппарат.

Принятые сокращения: Ма — макронуклеус, Ми — микронуклеус.

Ядерный аппарат инфузорий

Тип Ciliophora (ресничные простейшие, или инфузории) включает в себя около 8000 видов высокоорганизованных простейших, клетки которых на всех или некоторых стадиях жизненного цикла покрыты рядами ресничек (Догель, 1981; Lynn, Small, 2002). Последние представляют собой органеллы, обеспечивающие движение и питание этих одноклеточных эукариот. Другой характерной особенностью инфузорий является наличие в их клетке по крайней мере двух структурно и функционально различных ядер — обычно крупного вегетативного, или соматического, ядра (макронуклеуса — Ма) и более мелкого генеративного ядра (микронуклеуса — Ми). Ма и Ми образуются из дериватов зиготического ядра (синкариона), а их структурные и функциональные различия возникают в результате так называемой одновременной ядерной дифференцировки, которая приводит к появлению у простейшего двух или нескольких различных ядер в общей цитоплазме. Такое состояние в клетке инфузории принято называть ядерным диморфизмом (дуализмом) или ядерным гетероморфизмом (см. обзоры: Райков, 1978, 1989, 1992; Осипов, 1981; Raikov, 1982, 1995, 1996; Ammermann, 1990; Prescott, 1994, 1998).

Как правило, Ми представляет собой диплоидное ядро, размер которого варьирует от долей микрометра до 10 мкм. Обычно это ядро метаболически малоактивно. В нем РНК либо совсем не синтезируется, либо синтезиру-

ется на низком уровне, а ядрышки с помощью цитоморфологических методов не выявляются. Деление Ми происходит в форме закрытого внутриядерного ортомитоза, в ходе которого ядерная оболочка не разрушается (Raikov, 1994a). Вне периода полового процесса (конъюгации или автогамии) функции Ми в основном сводятся к хранению и передаче генетической информации в ряду агамных клеточных поколений (Райков, 1978; Осипов, 1981).

Вместе с тем для многих инфузорий Ми чрезвычайно важны для обеспечения жизнедеятельности вегетативных клеток. Так, у целого ряда представителей родов *Paramecium*, *Tetrahymena*, *Stylonychia*, *Euplotes* и некоторых других потеря Ми приводит к гибели клетки-организма уже через 2—3 сут (Fokin, Ossipov, 1981; Ng, 1986; Lu, Ng, 1991; Raikov, 1996). По некоторым данным, должны существовать какие-то специфические гены, экспрессирующиеся только в Ми (Ammermann, 1970; Tam, Ng, 1987). Однако эксперименты по выявлению таких генов пока не увенчались успехом (Kanay, Speare, 1992). Вместе с тем у некоторых клонов инфузорий-спиротрих, лишенных Ми, в Ма обнаружены особые микронуклеарные последовательности ДНК, которые, как полагают, компенсируют отсутствие генеративного ядра в клетках этих простейших (Karger, 1986). В то же время известно немало штаммов инфузорий, культивируемых в лаборатории (например, штамм GL *Tetrahymena pyriformis*) или выделенных из природных популяций (некоторые другие штаммы *T. pyriformis* и *Stylonychia lemnae*), которые

постоянно лишены Ми и при этом могут сохранять жизнеспособность в течение длительного времени (см.: Осипов, 1981; Ammermann et al., 2003). Таким образом, вопрос о природе вегетативной активности Ми до сих пор остается открытым.

Ма инфузорий — транскрипционно высокоактивное соматическое ядро. У многих известных видов этих простейших Ма имеет весьма крупные размеры (например, длину до 1—2 мкм) и сложную форму, например ленто-видную у *Bursaria truncatella* (Сергеева, 1977), четковидную у *Stentor coeruleus* (Tartar, 1961; Скарлато, 1977) или в виде разветвленной структуры у *Ephelota gemmipara* (Grell, 1953). У других представителей инфузорий отмечено несколько, а иногда множество вегетативных ядер. Например, у *Dilptus anser* насчитывается 200 Ма и более (Винникова, 1974). Как правило, соматические ядра инфузорий богаты ДНК, однако есть исключения, например кариореликты. Абсолютное содержание ДНК в Ма у мелких особей различных видов инфузорий варьирует от нескольких единиц до десятков пикограммов, а у особо крупных инфузорий — до нескольких тысяч пикограммов (Райков, 1989, 1992; Raikov, 1995, 1996).

Соматические ядра инфузорий-кариореликтов не способны к делению (Raikov, 1985, 1994b). При бесполом размножении этих простейших Ма делящейся клетки случайно распределяются между дочерними особями, а недостающие ядра затем развиваются из некоторых дочерних Ми в результате специфического процесса реорганизации последних (Raikov, 1985, 1994b). Однако Ма подавляющего большинства других инфузорий делятся, причем внешне эти деления похожи на митоз (Райков, 1978, 1992). При этом внутри или снаружи соматического ядра происходит сборка микротрубочек, а митотические веретена деления и хромосомы не идентифицируются.

У инфузорий агамное размножение особей обычно повторяется много раз подряд, после чего в их жизненном цикле наступает половой процесс в форме конъюгации или автогамии (Raikov, 1972, 1995). В ходе этого процесса в Ми происходит мейоз, приводящий к редукции числа хромосом. Затем в том и другом конъюгирующих партнерах гаплоидные дериваты мейотических Ми (стационарный и мигрирующий пронуклеусы различных партнеров при гетерогамии или стационарный и мигрирующий пронуклеусы одного партнера в случае автогамии) сливаются, в результате чего образуется диплоидное ядро — синкарион (Raikov, 1972, 1995). Последний делится несколько раз митозом, причем из одних дериватов этого зиготического ядра формируются Ми, а из других — зачатки новых Ма. Старый Ма разрушается, и далее его фрагменты резорбируются в автофагических вакуолях (см., например: Винникова, 1974; Скарлато, 1978). В деталях реконструкция ядерного аппарата после конъюгации или автогамии у разных видов инфузорий протекает неодинаково, однако в конце концов в клетке простейшего обязательно формируются ядра двух типов, различающихся структурно, генетически и функционально. При этом важно отметить, что дифференцировка Ми, в результате которой образуются Ма, всегда необратима.

В последние 30 лет исследования особенностей формирования новых Ма и причин необратимости этой дифференцировки проводились особенно интенсивно (Raikov, 1972, 1982, 1995, 1996; Райков, 1978, 1992; Ammermann, 1990; Prescott, 1994, 1997, 1998, 2000; Riley, Katz, 2001; Jahn, Klobutcher, 2002; Ardell et al., 2003; Yao et al.,

2003; Garnier et al., 2004; Meyer, Beisson, 2005). Всплеск интереса к Ма был прежде всего связан с бурным развитием методической базы современной биологии и поиском подходящих модельных объектов для изучения структуры и функций хромосом и ядерных геномов в целом. В результате этих исследований оказалось, что в онтогенезе всех изученных видов инфузорий геном Ма претерпевает глубокие преобразования (рис. 1). При этом, несмотря на обнаруженное разнообразие вариантов дифференцировки Ми, в результате которой образуется Ма, оказалось, что в развивающихся Ма обязательно происходят по крайней мере три события: 1) делеция и замена многих элементов исходного генома Ми, 2) многократное умножение оставшейся части генома генеративного ядра путем амплификации или полиплоидизации и 3) «перетасовка» сохранившихся в Ма генетических сегментов микронуклеарных хромосом.

Масштабы этих событий существенно варьируют у разных видов инфузорий. Так, в развивающихся Ма *Paramecium* и *Tetrahymena* редуцируется 10—20 % исходного генома, а оставшиеся нуклеотидные последовательности ДНК реплицируются, как правило, незначительно. Напротив, у инфузорий-спиротрих элиминируется до 90—95 % исходных последовательностей ДНК. В результате в зрелом Ма этих простейших молекулы ДНК микронуклеарных хромосом оказываются фрагментированными на короткие отрезки, которые обычно содержат всего один ген с соответствующими регуляторными и теломерными участками. Моно- или олигогенные фрагменты ДНК спиротрих размером от 0.4 до 23.0 т.п.н. представлены в Ма многими тысячами копий. По образному выражению первооткрывателя таких фрагментов ДНК американского исследователя Прескотта (Prescott et al., 1971), зрелый Ма инфузорий-спиротрих представляет собой «мешок со свободными генами».

Разные исследователи называли короткие фрагменты ДНК в Ма этих простейших молекулами ДНК генного размера («gene-sized DNA molecules»; Swanton et al., 1980), макронуклеарными хромосомами («macronuclear chromosomes»; Kreienberg et al., 1998), нанохромосомами («nanochromosomes»; Postberg et al., 2005) или мини-хромосомами («minichromosomes»; Hoffman et al., 1995). Пожалуй, в современной литературе в наибольшей степени закрепился термин «минихромосомы», хотя он, как и остальные три термина, не является бесспорным. Дело в том, что минихромосомы спиротрих не содержат центромеры и поэтому, строго говоря, могут называться хромосомами только условно. Кроме того, минихромосомами называют и некоторые другие типы хромосом простейших, например линейные минихромосомы размером 50—150 т.п.н. некоторых видов африканских трипаносом. Минихромосомы этих паразитических жгутиконосцев на 90 % состоят из тандемно расположенных повторов размером 177 п.н., а из кодирующих белок генов могут содержать только гены различных вариантов поверхностного гликопротеида, причем в транскрипционно неактивной форме (Weiden et al., 1991).

Несмотря на указанные выше терминологические трудности, мы считаем целесообразным не множить число новых терминов для обозначения моногенных или олигогенных хромосом простейших, а принять для них общий термин «минихромосома», уточняя каждый раз их принадлежность к соответствующим типам ядер и систематическим группам одноклеточных эукариот. Таким образом, моно- и олигогенные хромосомы зрелых веге-

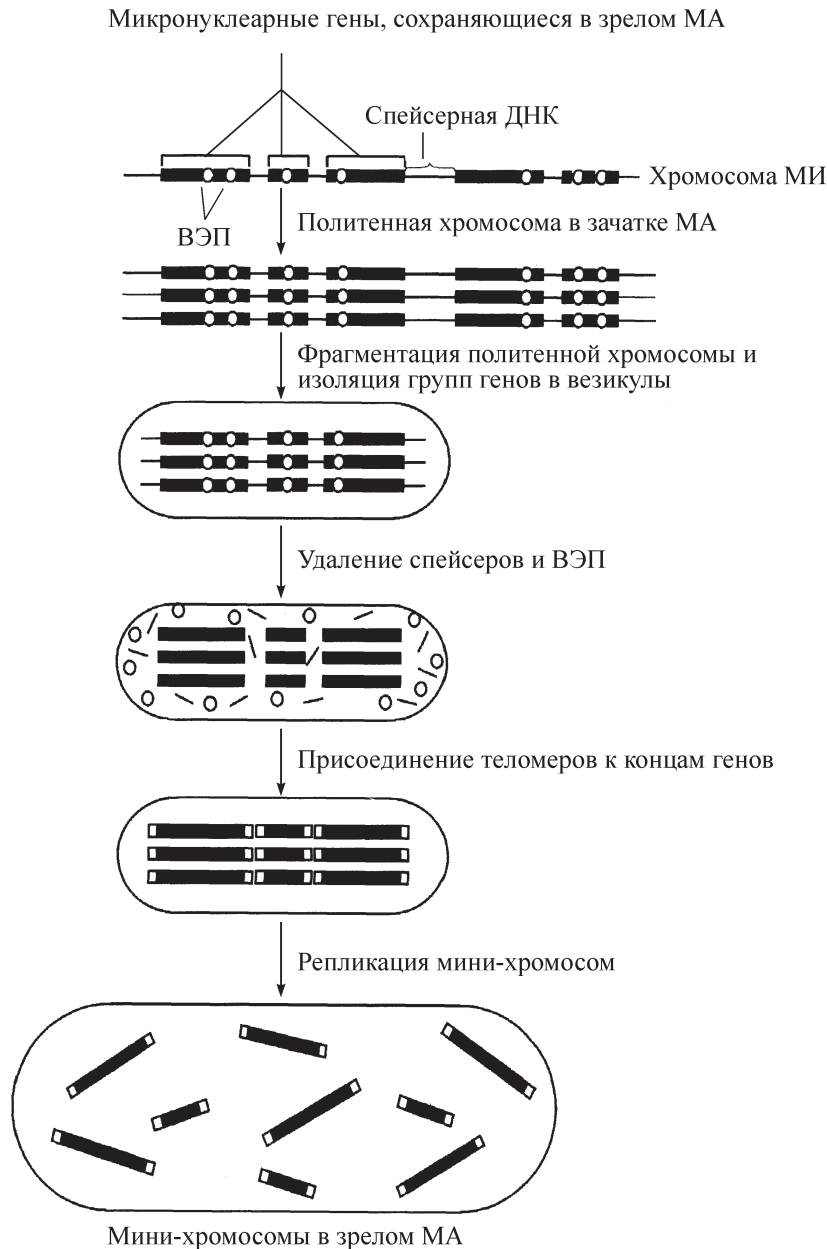


Рис. 1. Схема, иллюстрирующая фрагментацию политенных хромосом и формирование минихромосом в зачатке нового макронуклеуса у инфузорий-спиротрих после конъюгации (по: Klobutcher, Prescott, 1986; модифицировано).

ВЭП — внутренние элиминируемые нуклеотидные последовательности в раннем зачатке макронуклеуса.

Fig. 1. Schematic drawing of major stages of macronuclear minichromosome development in the exconjugant cells of spirotrichous ciliates (After: Klobutcher, Prescott, 1986; modified).

ВЭП — internal eliminated sequences in early macronuclear primordium.

тативных ядер инфузорий-спиротрих мы будем называть в настоящем обзоре мини-хромосомами Ма спиротрих.

Мини-хромосомы Ма представителей некоторых родов спиротрих, например *Stylonychia* (Elsevier et al., 1978; Lipps et al., 1978; Ammermann, 1990; Steinbrueck, 1990; Maercker et al., 1999; Jonsson et al., 2001), *Euplotes* (Roth, Prescott, 1985; Tausta, Klobutcher, 1990; Ghosh et al., 1994; Aigner, Cech, 2004; Mollenbeck et al., 2004; Wang et al., 2005), *Oxytricha* (в настоящее время виды *O. trifalax* и *O. nova* перенесены в род *Sterkiella* и переименованы в *S. histriomuscorum* и *S. nova* соответственно) (Zahler, Prescott, 1988; Greslin et al., 1989; Zahler, Pre-

scott, 1989; Williams, Herrick, 1991; Foissner, Berger, 1999; Prescott et al., 2002; Cavalcanti et al., 2004a, 2004b; Lescasse et al., 2005), во многом оказались удобными моделями для изучения структурной организации «минимально возможных» эукариотных хромосом и регуляции генной активности у эукариот. К числу таких модельных объектов в первую очередь следует отнести мини-хромосомы Ма инфузории *Stylonychia lemnae* (Helftenbein, 1985; Conzelmann, Helftenbein, 1987; Maercker, Lipps, 1993; Kreyenberg et al., 1998; Skovorodkin et al., 1999, 2001a; Landweber et al., 2000; Lozupone et al., 2001; Райхель, 2003; Ammermann et al., 2003; Ardell et al., 2003).

Особенности морфологической и ультраструктурной организации макронуклеуса *Stylonychia lemnae*

Инфузория *Stylonychia lemnae* (рис. 2) была описана как близкородственный вид широкоизвестного *S. mytilus* (Ammermann, Schlegel, 1983). Морфологически оба вида этих инфузорий схожи, однако *S. lemnae* несколько крупнее. Особи *S. mytilus* и *S. lemnae* могут вступать в конъюгацию, однако они не дают потомства. Отметим также, что, по мнению Аммерманна и Шлегеля (Ammermann, Schlegel, 1983), данные по морфологии и ультраструктуре *S. mytilus* в работах, опубликованных до 1983 г., в действительности были получены на *S. lemnae*. Поэтому в настоящей работе при рассмотрении данных этих публикаций речь будет идти о *S. lemnae*.

Ядерный аппарат вегетативной особи *S. lemnae* обычно представлен двумя-четырьмя Ми и одним гантелевидным Ма (рис. 2), узкая перемычка которого содержит пучки микрофиламентов (рис. 3). Оболочка Ма имеет классическое двухмембранное строение и пронизана порами с поровыми комплексами. На ультратонких срезах хроматин Ма организован в виде сети анастомозирующих тяжей, среди которых выявляется несколько крупных ядрышек (рис. 4, а, б). Во многих местах хроматиновые тяжи контактируют с внутренней мембраной оболочки Ма (рис. 4, а, б; Walker, Goode, 1976).

В промежутке между делениями Ма *S. lemnae* репликация ДНК в нем происходит строго упорядоченно по всей его длине. При этом ДНК синтезируется только в двух специфических участках Ма — репликационных полосках, которые перемещаются от дистальных концов Ма к его центру. Интересно, что перед делением Ма, т. е. после окончания периода синтеза ДНК и исчезновения репликационных полосок, у *S. lemnae* гантелевидный Ма преобразуется в одно большое сферическое тело (рис. 5). Хроматиновые тяжи в этом теле располагаются концентрически, что, как полагают, указывает на вращательное перемещение хроматиновых элементов в Ма (Walker, Goode, 1976). При этом между хроматиновыми тяжами

полимеризуются хаотически ориентированные микротрубочки, которые, по-видимому, участвуют в процессе «перемешивания» хроматина. В ходе описанных процессов хроматиновые тяжи утрачивают связь с внутренней мембраной ядерной оболочки, к которой они были прикреплены в остальных фазах клеточного цикла (рис. 5; Walker, Goode, 1976; Raikov, 1982). Рассматриваемые данные свидетельствуют о перераспределении хроматина и изменении конфигурации хроматиновых элементов Ма при формировании сферического тела (Walker, Goode, 1976; Raikov, 1982).

Деление Ма *S. lemnae* надвое, как и у других инфузорий, напоминает амитоз. Сначала, как отмечалось выше, компактное ядро вытягивается в длину, а затем перешнуровывается на две части. При этом на ультратонких срезах Ма в фазах его вытягивания и перешнуровки выявляются внутриядерные микротрубочки, которые на полюсах фигуры деления упираются в оболочку Ма (Walker, Goode, 1976; Raikov, 1982). Таким образом, в целом по своей морфологии и ультраструктуре Ма *S. lemnae* подобен Ма большинства других инфузорий.

Формирование зачатков новых Ма у *S. lemnae* после конъюгации сопровождается масштабной реорганизацией генетического материала соответствующих дериватов синкариона. У спиротрих в отличие от подавляющего большинства других инфузорий в зачатках Ма формируются политенные хромосомы. Впервые светоптически такие хромосомы были описаны именно у *S. lemnae* (Ammermann, 1964, 1965), а затем и у некоторых других видов инфузорий (см. обзоры: Alonso, 1978; Raikov, 1982; Kraut et al., 1986; Ammermann, 1987). Развитие зачатка Ма *S. lemnae* начинается с конденсации хромосом диплоидного деривата синкариона. При этом все конденсированные хромосомы располагаются преимущественно по периферии зачатка (Ammermann et al., 1974). На этой стадии ядерной дифференцировки содержание ДНК в зачатках Ма в 4 раза превышает уровень, характерный для синкариона. Затем менее трети всех хромосом вновь деконденсируются, становятся нитевидными и перемещаются к центру зачатка Ма. Остальные

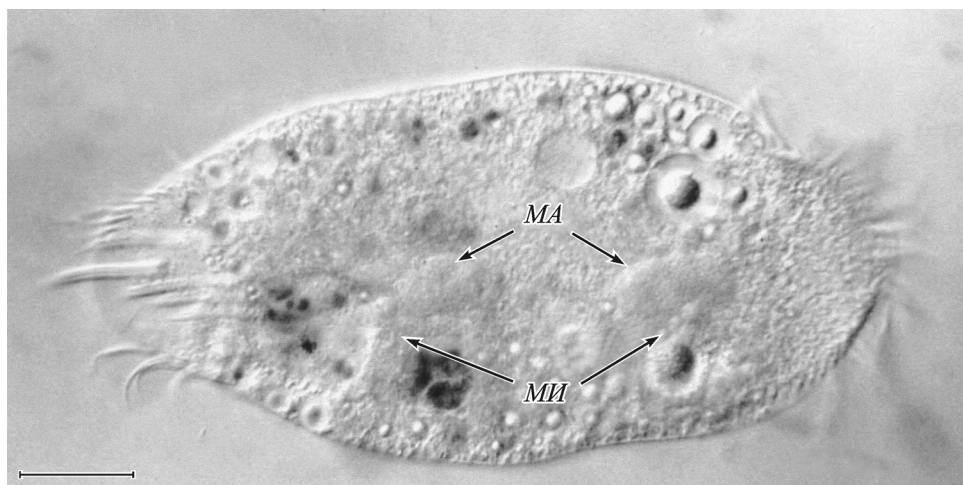


Рис. 2. Инфузория-спиротриха *Stylonychia lemnae*.

МА — макронуклеус, МИ — микронуклеус. Дифференциально-интерференционный контраст. Масштабная линейка — 30 мкм.

Fig. 2. Micrograph of *Stylonychia lemnae*, a spirotrichous ciliate.

MA — macronucleus, MI — micronucleus. Differential interference contrast. Bar — 30 μm.



Рис. 3. Электронограмма фрагмента гантелевидного макронуклеуса *Stylonychia lemnae*.
В узкой перемычке ядра находится пучок микрофиламентов (мф); *яо* — ядерная оболочка. Масштабная линейка — 5 мкм.

Fig. 3. Electron micrograph of *Stylonychia lemnae*; a narrow isthmus of a dumbbell macronucleus contains a bunch of microfilaments.
мф — microfilaments, *яо* — nuclear envelope. Bar — 5 μ m.

хромосомы остаются компактными и располагаются по периферии ядра. Позднее именно эти хромосомы дегенерируют. Таким образом, уже на самой ранней стадии развития нового Ма *S. lemnae* его геном значительно редуцируется в результате хромосомной диминуции.

Сохранившиеся политенизированные хромосомы приобретают лентовидную форму, и в них обнаруживаются чередующиеся поперечные темные диски и светлые междисковые участки. Диски у таких хромосом представляют собой скопления нитей хроматина толщиной 30 нм и длиной 10—200 т.п.н. Междисковые участки образованы нитями хроматина толщиной 10 нм и длиной 1—10 т.п.н. (Kraut et al., 1986).

Электронно-микроскопические исследования лентовидных хромосом *S. lemnae* показали, что после завершения их политенизации они фрагментируются (Kloetzel, 1970; Gil et al., 1972). Процесс фрагментации начинается с появления фибриллярного материала в междисковых промежутках. В результате политенные хромосомы оказываются рассеянными этим материалом на отдельные диски, которые позднее оказываются заключенными в отдельные пузырьки с фиброзной стенкой. После попадания в такие пузырьки большая часть дисков разрушается, а содержание ДНК в ядре резко снижается. Таким образом, содержание ДНК в зачатке Ма почти возвращается к исходному уровню, поскольку более 90 % ДНК политенных хромосом подвергается деструкции (Ammermann, 1965, 1971).

В конце фазы элиминации ДНК стенки пузырьков с сохранившимися отдельными дисками в зачатке Ма разрушаются и формирующийся Ма входит в новую фазу дифференцировки, обычно называемую ахроматической.

В этой фазе дифференцировки Ма на ультратонких срезах его зачатков выявляются мелкие глыбки плотного хроматина. Далее в ядре начинается синтез РНК и формируются ядрышки. Вскоре в зачатке нового Ма происходит вторая фаза синтеза ДНК, связанная с прохождением через ядро 5 пар репликационных полосок. В результате этого процесса содержание ДНК в зачатке Ма возрастает в 32 раза по сравнению с таковым в ахроматической фазе дифференцировки. После завершения синтеза ДНК зачаток Ма постепенно приобретает дефинитивную гантелевидную форму (Ammermann et al., 1974).

Представленные данные свидетельствуют о том, что в ходе дифференцировки зачатка Ма *S. lemnae* происходят две последовательные диминуции генетического материала. Первая связана с деградацией значительной части целых хромосом, а вторая — с разрушением огромного числа фрагментов сохранившихся политенизированных хромосом. В результате в дефинитивном Ма *S. lemnae* могут существовать только весьма короткие фрагменты небольшой части хромосом исходного деривата синкариона. Количество же этих фрагментов, которые в дальнейшем и получили название «мини-хромосомы Ма спиротрих», оказывается многократно умноженным. По современным представлениям, полный геном зрелого Ма *S. lemnae* содержит 12—36 (Hoffman et al., 1995) или 15—24 (Kreyenberg et al., 1998) тыс. генов, которые локализируются в моногенных, реже олигогенных мини-хромосомах. Размер таких хромосом варьирует от нескольких сотен до 20 тыс. п.н. При этом в Ма содержится в среднем по 15 000 копий каждой мини-хромосомы (Ammermann, 1990; Prescott, 1994). Исключение составляют, пожалуй, только «рибосомные» мини-хро-

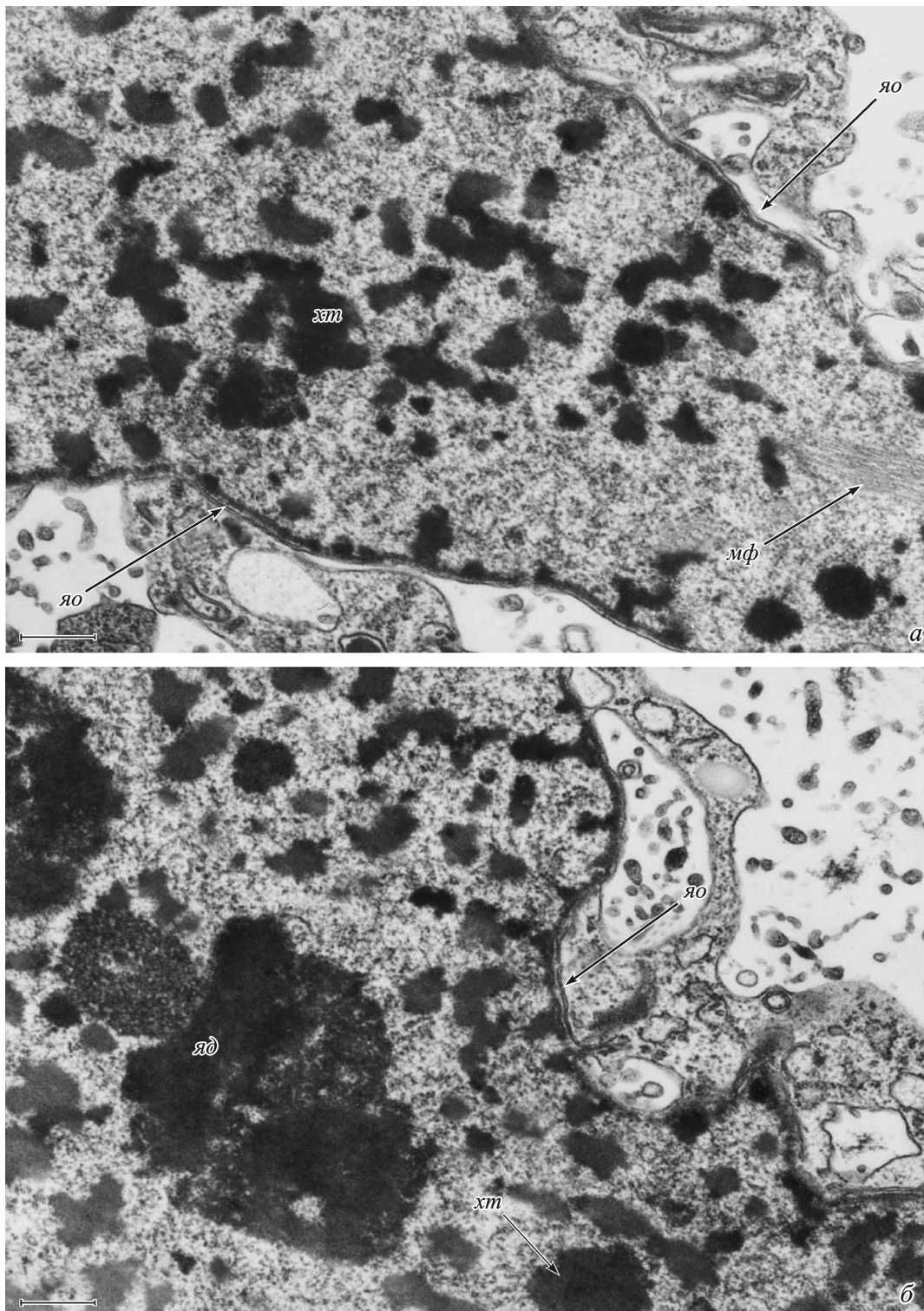


Рис. 4. Ультраструктура макронуклеуса *Stylonychia lemnae*.

а — анастомозирующие хроматиновые тяжи (хт) во фрагменте макронуклеуса; б — ядрышко (яд) в макронуклеусе. мф — микрофиламенты, яо — ядерная оболочка. Масштабные линейки — 5 мкм.

Fig. 4. The fine structure of the macronucleus of *Stylonychia lemnae*.

а — network of dense chromatin trabeculae (хт). б — nucleolus (яд). мф — microfilaments, яо — nuclear envelope. Bars — 5 μm.

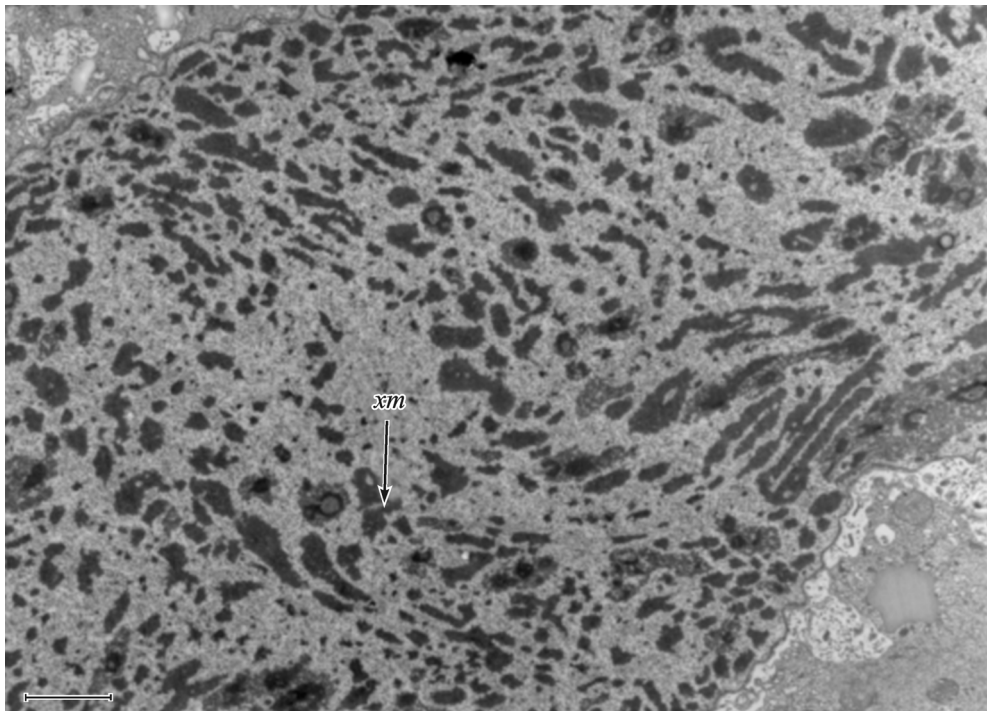


Рис. 5. Электронограмма макронуклеуса *Stylonychia lemnae*, преобразовавшегося в сферическое тело перед его делением.
 xt — анастомозирующие хроматиновые тяжи. Масштабная линейка — 10 мкм.

Fig. 5. The macronucleus of *Stylonychia lemnae* at the stage of a spherical body shortly before the nuclear division.
 xt — anastomosing chromatin trabeculae. Bar — 10 μ m.

мосомы и высокоамплифицированные минихромосомы, функция которых до конца неясна. Число этих минихромосом в Ма *S. lemnae* во много раз превышает число большинства других минихромосом (Lipps et al., 1978; Wegner et al., 1989; Kreyenberg et al., 1998). В заключение отметим, что, по нашим оценкам, суммарное количество минихромосом в Ма *S. lemnae* может достигать нескольких миллионов.

Мини-хромосомы макронуклеуса *Stylonychia lemnae*

К решению проблемы структурно-функциональной организации мини-хромосом Ма *S. lemnae* и других видов спиротрих удалось приблизиться только с наступлением «молекулярной эры» в изучении ядерного аппарата инфузорий. Оказалось, что каждый тип мини-хромосом Ма *S. lemnae* содержит чаще всего одну, реже две открытые рамки считывания и полный набор необходимых регуляторных элементов, что упрощает изучение репликации ДНК мини-хромосом и транскрипции содержащихся в них генов (рис. 6; Seegmiller et al., 1997; Pimenov et al., 2002; Zassoukhina et al., 2002). У стилонихий открытая рамка считывания начинается с триплета АТG, кодирующего метионин, и заканчивается стоп-кодоном TGA. Интересно, что у представителей двух других родов спиротрих — *Oxytricha* и *Euplotes* — открытая рамка считывания также начинается с триплета АТG, однако заканчивается она у окситрих стоп-кодоном TGA, а у эуплотесов — триплетом TAA, реже триплетом TAG (Helftenbein, 1985; Gray et al., 1991; Meyer et al., 1991; Hoffman et al., 1995).

Гены Ма *S. lemnae*, как и макронуклеарные гены других спиротрих, крайне редко содержат интроны (Hoffman et al., 1995). Фланкирующие участки мини-хромосомных ДНК *S. lemnae* (последовательности ДНК, ограничивающие кодирующий участок молекулы: справа — трейлер, слева — лидер) значительно варьируют в размерах и в большинстве случаев содержат не более 200 п.н. (рис. 6; Hoffman et al., 1995). Для некодирующих участков мини-хромосомных ДНК этих инфузорий характерно высокое содержание нуклеотидов, в которых азотистые основания представлены аденином (нуклеотиды А) и тиминном (нуклеотиды Т). Так, 5'-фланкирующие участки мини-хромосом *S. lemnae* в среднем содержат 70 % нуклеотидов А и Т, а 3'-фланкирующие участки — 76 %. Отмеченное обстоятельство значительно затрудняет поиск АТ-богатых регуляторных элементов мини-хромосом, например таких, как ТАТА-бокс.

На концах всех мини-хромосом *S. lemnae* расположены короткие теломеры, образованные 20 парами нуклеотидов 5'-С₄А₄С₄А₄С₄-3' и дополнительно еще одним неспаренным 16-нуклеотидным элементом Т₄Г₄Т₄Г₄ на 3'-конце молекулы ДНК (рис. 6; Klobutcher et al., 1981; Hoffman et al., 1995).

Установлено, что у *S. lemnae* транскрибируется приблизительно 60 % генома Ма. Если учесть, что молекулы ДНК содержат также нетранскрибируемые последовательности, получается, что у данного вида инфузорий экспрессируется подавляющее большинство макронуклеарных генов (Nock, 1981). Более того, с помощью экспериментов по ДНК-РНК-гибридизации показано, что около 90 % всех молекул ДНК Ма стилонихий содержат последовательности, присутствующие в тотальной РНК, изолированной из клеток этих инфузорий (см. обзор: Кло-



Рис. 6. Схема строения мини-хромосомы *Stylonychia lemnae*.

В рамках справа и слева указаны нуклеотидные последовательности теломеров; лидер и трейлер — 5'- и 3'-фланкирующие нетранслируемые участки.

Fig. 6. Schematic drawing of a minichromosome of *Stylonychia lemnae*.

Telomere sequences are shown in the right and left frames; лидер and трейлер — 5'- and 3'-flanking nontranslated regions, respectively.

butcher, Prescott, 1986). Если предположить, что некоторые гены могут экспрессироваться лишь периодически, то получается, что все или почти все мини-хромосомы *S. lemnae* имеют транскрибируемые участки. Таким образом, транскрипционный потенциал Ма *S. lemnae* чрезвычайно высок.

На рубеже XX и XXI вв. для изучения структуры и функций генетического аппарата Ма *S. lemnae* и некоторых других спиротрих стали широко использовать два подхода. Первый базируется на сравнительном анализе нуклеотидных последовательностей мини-хромосомных ДНК спиротрих с нуклеотидными последовательностями ДНК различных эукариот, включая инфузорий из других систематических групп (Hoffman et al., 1995). Для краткости назовем такой способ поиска регуляторных последовательностей ДНК сравнительно-молекулярным методом. Второй подход (назовем его экспериментальным) — это изучение репликации и транскрипции генов спиротрих посредством генетической трансформации инфузорий искусственными конструкциями ДНК, созданными на базе нативных мини-хромосом инфузорий. При этом для изучения репликации и транскрипции в Ма *S. lemnae* инъецировали конструкции из мини-хромосомных ДНК, содержащие мутации в анализируемых областях этих молекул (рис. 7; Skovorodkin et al., 1999, 2001a, 2001b; Pimenov et al., 2002; Райхель, 2003).

Сравнительно-молекулярный подход в изучении минихромосом Ма *S. lemnae* главным образом был направлен на поиск у этой спиротрихи кодирующих и регуляторных последовательностей ДНК, уже известных для

других эукариот (Helftenbein, 1985; Conzelmann, Helftenbein, 1987; Helftenbein, Muller, 1988; Helftenbein et al., 1989; Hoffman et al., 1995; Kreyenberg et al., 1998; Maercker et al., 1999). К сожалению, большинство исследователей этим уровнем изучения мини-хромосом *S. lemnae* ограничивались, что привело к возникновению целого ряда противоречащих друг другу представлений о генетической структуре мини-хромосом.

Сложившееся положение дел можно проиллюстрировать на примере изучения четырех типов мини-хромосом Ма *S. lemnae*, гены которых кодируют тубулины. Так, в более ранних работах при рассмотрении механизмов регуляции транскрипции генов, кодирующих $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, $\beta 1$ - и $\beta 2$ -тубулины, не удалось сразу прийти к однозначному выводу о составе регуляторных последовательностей соответствующих мини-хромосом (Helftenbein, 1985). Изучение 5'-некодирующей области в генах $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -тубулинов позволило сделать предположение о наличии ТАТА-подобных последовательностей, расположенных на 165, 140 и 41 п.н. левее точки начала трансляции (рис. 8; Helftenbein, 1985). При этом начальная точка транскрипции (так называемая точка +1, где расположен первый транскрибирующийся нуклеотид в кодирующей области ДНК) экспериментально определена не была.

В более поздних работах той же исследовательской группы (Helftenbein, Muller, 1988) локализация точки инициации транскрипции была предсказана в положении 41 п.н. левее точки инициации трансляции (рис. 8; Helftenbein, Muller, 1988). На основании этих данных было высказано предположение о том, что в промоторе гена

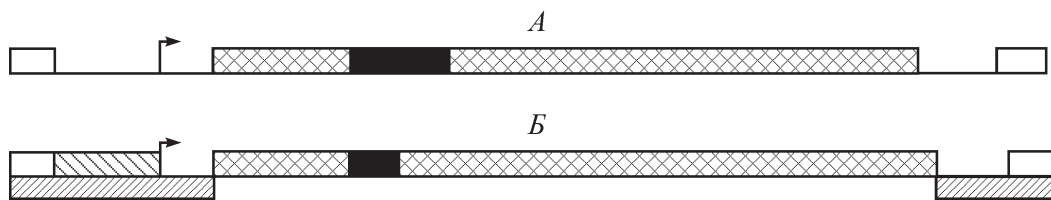


Рис. 7. Схема ДНК-конструкций, синтезированных на основе $\alpha 1$ -тубулиновой мини-хромосомы и используемых для трансфекции *Stylonychia lemnae*.

А — ДНК-конструкция, содержащая олигонуклеотидную вставку размером 49 п.н. и использовавшаяся в экспериментах в качестве внутреннего контроля; Б — ДНК-конструкция, содержащая мутации (делеции и замены нуклеотидов) в анализируемых областях и олигонуклеотидную вставку размером 19 п.н. Флажки — точки начала транскрипции; белые прямоугольники — теломеры; черные прямоугольники — олигонуклеотидные вставки; прямоугольники с клетчатой штриховкой — кодирующие участки мини-хромосом; прямоугольники с косой штриховкой с наклоном вправо — участки мини-хромосом, в которых производили поиск регуляторных последовательностей ДНК, контролирующей репликацию; прямоугольники с косой штриховкой с наклоном влево — участки мини-хромосом, в которых производили поиск регуляторных последовательностей ДНК, контролирующей транскрипцию.

Fig. 7. Scheme of DNA-constructions synthesized on the base of $\alpha 1$ -tubulin-encoding minichromosome of *Stylonychia lemnae* applied for transfection experiments.

А — DNA-construction with oligonucleotide insertion of 49 b.p.; it is applied as a internal control in all experiments. Б — DNA-construction with oligonucleotide insertion of 19 b.p.; it contains mutations (deletions and nucleotide replacements) in analysed regions. The scheme shows: flags — transcription initiation points; white fields — telomeres; black fields — oligonucleotide insertions; fields with checked hading — opening reading frames; fields with right lopsided line shading — regions where replication regulatory elements were searched; fields with left lopsided line shading — regions where transcription regulatory elements were searched.

α-1 тубулин

Helftenbein, 1985 TCAGTTATAA TAATAGTTCA AACGATAAAT TATAAAATTT GAATTAGTTA AGATTCCCCT
 Helftenbein, Muller, 1988 TCAGTTATAA TAATAGTTCA AACGATAAAT TATAAAATTT GAATTAGTTA AGATTCCCCT
 Helftenbein et al., 1989 TCAGTTATAA TAATAGTTCA AACGATAAAT TATAAAATTT GAATTAGTTA AGATTCCCCT
 Steinbruck, 1990 TCAGTTATAA TAATAGTTCA AACGATAAAT TATAAAAATTT GAATTAGTTA AGATTCCCCT
 Pimenov et al., 2002 TCAGTTATAA TAATAGTTCA AACGATAAAT TATAAAAATTT GAATTAGTTA AGATTCCCCT
 -170 -160 -150 -140 -130 -120

ATTCAAAAAT TAAGAGGGTC TTTCATATCC ATTCAAATAT ATCTTAAATA CTTAAACTTA
 ATTCAAAAAT TAAGAGGGTC TTTCATATCC ATTCAAATAT ATCTTAAATA CTTAAACTTA
 ATTCAAAAAT TTAAGAGGGTC TTTCATATCC ATTCAAATAT ATCTTAAATA CTTAAACTTA
 ATTCAAAAAT TTAAGAGGGTC TTTCATATCC ATTCAAATAT ATCTTAAATA CTTAAACTTA
 ATTCAAAAAT TAAGAGGGTC TTTCATATCC ATTCAAATAT ATCTTAAATA CTTAAACTTA
 -110 -100 -90 -80 -70 -60

ACTAGTAATT ATAATTATTT CATTTTTTCA AACAAAATCA ACTCTTCATC **ATG**
 ACTAGTAATT TATAATTATTT CATTTTTTCA AACAAAATCA ACTCTTCATC **ATG**
 ACTAGTAATT ATAATTATTT CATTTTTTCA AACAAAATCA ACTCTTCATC **ATG**
 ACTAGTAATT ATAATTATTT CATTTTTTCA AACAAAATCA ACTCTTCATC **ATG**
 ACTAGTAATT ATAATTTATTT CATTTTTTCA AACAAAATCA ACTCTTCATC **ATG**
 -50 -40 -30 -20 -10 0

α-2 тубулин

Helftenbein, Muller, 1988 CCTATAAATA GCGAAATAAA GTGGGAAATTATAACTTTAT TTTATATTA AACAAAATCA AATCTTCATC **ATG**
 Helftenbein et al., 1989 CCTATAAATA GCGAAATAAA GTGGGAAATTATAACTTTAT TTTATATTA AACAAAATCA AATCTTCATC **ATG**
 Steinbruck, 1990 CCTATAAATA GCGAAATAAA GTGGGAAATTATAACTTTAT TTTATATTA AACAAAATCA AATCTTCATC **ATG**
 Pimenov et al., 2002 CCTATAAATA GCGAAATAAA GTGGGAAAT ATAACTTTAT TTTATATTA AACAAAATCA AATCTTCATC **ATG**
 -70 -60 -50 -40 -30 -20 -10 0

β-1 тубулин

Conzelmann, Helftenbein, 1987 TAAATTTTAA ATTCAGAGAA TGAATATAAG GATACCAATT TTAAGAAGTA TTAATTTTC TTAATTTTCA AAAACAAAACC **ATG**
 Helftenbein et al., 1989 TAAATTTTAA ATTCAGAGAA TGAATATAAG GATACCAATT TTAAGAAGTA TTAATTTTC TTAATTTTCA AAAACAAAACC **ATG**
 Steinbruck, 1990 TAAATTTTAA ATTCAGAGAA TGAATATAAG GATACCAATT TTAAGAAGTA TTAATTTTC TTAATTTTCA AAAACAAAACC **ATG**
 Pimenov et al., 2002 TAAATTTTAA ATTCAGAGAA TGAATATAAG GATACCAATT TTAAGAAGTA TTAATTTTC TTAATTTTCA AAAACAAAACC **ATG**
 -80 -70 -60 -50 -40 -30 -20 -10 0

β-2 тубулин

Conzelmann, Helftenbein, 1987 TGTTATAAAT ATGCGCCCTC TCTAACTAAT ATATAATTC AATAATTTTC AAAACAAAAC TCAAGTCACA **ATG**
 Helftenbein et al., 1989 TGTTATAAAT ATGCGCCCTC TCTAACTAAT ATTAATTC AATAATTTTC AAAACAAAAC TCAAGTCACA **ATG**
 Steinbruck, 1990 TGTTATAAAT ATGCGCCCTC TCTAACTAAT ATATAATTC AATAATTTTC AAAACAAAAC TCAAGTCACA **ATG**
 Pimenov et al., 2002 TGTATAAAT ATGCGCCCTC TCTAACTAAT ATATAATTC AATAATTTTC AAAACAAAAC TCAAGTCACA **ATG**
 -70 -60 -50 -40 -30 -20 -10 0

Рис. 8. Структура промоторов в генах тубулинов *Stylonychia lemnae* по данным разных авторов.

Представлены лидирующие некодирующие участки генов α- и β-тубулина. *Жирным шрифтом* выделены триплеты ATG, с которых начинаются транслируемые участки генов. ТАТА-боксы *подчеркнуты*. Точки инициации транскрипции выделены *жирным шрифтом и подчеркнуты двойной линией*.

Fig. 8. Structure of promoters in tubulin genes of *Stylonychia lemnae* according to different authors.

The figure shows uncoding leader sequences of α- and β-tubulin genes. ATG triplets (the beginning of open reading frame) are marked in *bold*. TATA-boxes are *underlined*. Transcription initiation points are in *bold and underlined with double line*.

$\alpha 2$ -тубулина имеется ТАТА-бокс, расположенный на 27 п.н. левее точки инициации транскрипции, или на 68 п.н. левее точки инициации трансляции (рис. 8; Helftenbein et al., 1989). При этом в гене $\alpha 1$ -тубулина был обнаружен лишь ТАТА-подобный элемент на 99—104 п.н. левее точки инициации транскрипции, или на 140—145 п.н. левее точки инициации трансляции (рис. 8; Helftenbein, Muller, 1988; Helftenbein et al., 1989). Таким образом, данные, полученные в результате только сравнительного анализа последовательностей ДНК, свидетельствовали о существенных различиях в механизме регуляции инициации транскрипции в генах $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -тубулинов у *S. lemnae*.

В ходе дальнейших сравнительных исследований нуклеотидных последовательностей разными авторами были получены различные результаты относительно локализации точек инициации транскрипции и местоположения регуляторных элементов в исследуемых генах (рис. 8; Helftenbein et al., 1989; Steinbruck, 1990). Таким образом, результаты только сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей в очередной раз привели к изменению представлений о локализации предполагаемого ТАТА-бокса в мини-хромосомах *S. lemnae*.

Теоретические расчеты, касающиеся локализации точки инициации транскрипции и строения промотора в генах $\beta 1$ - и $\beta 2$ -тубулина *S. lemnae*, оказались более однородными. Так, было установлено, что в гене $\beta 1$ -тубулина точка инициации транскрипции расположена на 46 п.н. левее точки инициации трансляции, а в гене $\beta 2$ -тубулина — на 37—38 п.н. левее (рис. 8; Conzelmann, Helftenbein 1987; Helftenbein et al., 1989). Исходя из этих данных каноническая последовательность ТАТА-бокса была обнаружена только в гене $\beta 2$ -тубулина в положении на 28—29 п.н. левее точки инициации транскрипции. Для гена $\beta 1$ -тубулина на тот момент наших знаний представлялось возможным говорить только о наличии ТАТА-подобного элемента, расположенного на 34 п.н. левее точки инициации транскрипции (рис. 8; Helftenbein et al., 1989).

Достаточно противоречивыми оказались также результаты сравнительного исследования нуклеотидных последовательностей, отвечающих за репликацию мини-хромосом *S. lemnae*, которые несут гены тубулинов (Conzelmann, Helftenbein 1987; Helftenbein, Muller, 1988; Helftenbein et al., 1989; Maercker, Lipps, 1993). В частности, в ДНК таких мини-хромосом были выявлены АТ-богатые полуконсервативные палиндромные последовательности нуклеотидов, расположенные вблизи теломеров. Первоначально было высказано предположение о том, что именно в этих сегментах ДНК локализована точка начала репликации (точка *ori*) мини-хромосом (Helftenbein, 1985; Conzelmann, Helftenbein 1987; Helftenbein, Muller, 1988; Helftenbein et al., 1989; Maercker, Lipps, 1993). Однако с этой гипотезой не согласилась группа исследователей, которые на основании собственных данных пришли к выводу о том, что в мини-хромосомах *S. lemnae* и других спиротрих точка *ori* находится в теломерах (Zahler, Prescott, 1988, 1989; Hoffman et al., 1995). Таким образом, при отсутствии корректной экспериментальной проверки теоретических заключений о локализации точки *ori*, сделанных на основании сравнительно-молекулярного анализа соответствующих нуклеотидных последовательностей, не представлялось возможным выяснить, где в действительности локализована точка инициации репликации мини-хромосом *S. lemnae*.

Очевидные недостатки изучения регуляторных участков мини-хромосом *S. lemnae* только с помощью сравнительно-молекулярного анализа последовательностей ДНК побудили молекулярных биологов приступить к разработке более сложного, экспериментального подхода к исследованию этой проблемы (Wunning, Lipps, 1983; Meyers, Helftenbein, 1988). В этом случае для изучения механизмов репликации ДНК и транскрипции в мини-хромосомах *S. lemnae* используют клонированные генетические конструкции ДНК, созданные на основе мини-хромосом. Эти конструкции ДНК содержат как нативные элементы мини-хромосом (кодирующая область, фланкирующие последовательности и теломеры), так и элементы с мутациями, полученными в результате делеций и точечных замен соответствующих последовательностей, а также встраивания олигонуклеотидных вставок в предполагаемые регуляторные сегменты мини-хромосом.

Экспериментальная работа такого типа была существенно облегчена небольшими размерами мини-хромосомных ДНК, отсутствием в их кодирующей области интронов и наличием в этих ДНК единственной рамки считывания. По существу при работе с искусственными мутантными мини-хромосомами *S. lemnae* исследователю приходилось иметь дело с весьма компактной репликационно-транскрипционной единицей, что существенно упрощало клонирование небольших мини-хромосомных ДНК и обеспечивало возможность собирать на основе мини-хромосом генетические векторы, содержащие мутации в заранее определенных областях.

Далее эти искусственные конструкции ДНК инъецировали в Ма клеток-реципиентов, вызывая таким образом генетическую трансформацию инфузорий (Skovorodkin et al., 1999, 2001a, 2001b; Pimenov et al., 2002; Райхель, 2003; Ammermann et al., 2003). При этом особенности транскрипции и репликации мутантных мини-хромосом в трансформированных клетках позволяли судить о функциональной значимости той или иной нуклеотидной последовательности мини-хромосом (Skovorodkin et al., 2001a, 2001b; Pimenov et al., 2002; Райхель, 2003).

В последние годы при помощи экспериментального подхода с использованием мутантных конструкций ДНК было показано, что удаление или замена кодирующего участка, а также 5'- и 3'-фланкирующих последовательностей не приводит к нарушению эффективной репликации мини-хромосом (Skovorodkin et al., 2001b). Вместе с тем мини-хромосомы с удаленными теломерами оказывались неспособными к репликации и быстро исчезали в ряду клеточных поколений (Skovorodkin et al., 2001b). Отсюда находит свое подтверждение гипотеза, в соответствии с которой точка начала репликации мини-хромосом находится в их теломерах (Zahler, Prescott, 1988, 1989; Hoffman et al., 1995).

Использование мутантных конструкций ДНК при изучении мини-хромосом *S. lemnae* позволило пролить свет на еще одну ключевую проблему молекулярной биологии инфузорий — проблему регуляции числа копий различных генов при их распределении в дочерние ядра в ходе деления Ма. Как уже отмечалось, Ма инфузорий делится особым образом, и его деление только внешне напоминает митоз (Райков, 1978). При делении Ма кинетохоры и веретено деления не формируются, хотя микротрубочки в кариоплазме или в цитоплазме вблизи ядерной оболочки все же обнаруживаются. В це-

лом механизм, обеспечивающий равное распределение генетического материала материнского ядра между дочерними Ма, остается малоизвестным. Однако полагают, что необычный способ деления Ма скорее всего возник в результате модификации митоза (Райков, 1978).

Существуют две основные гипотезы, объясняющие, каким образом происходит «амитоз» Ма инфузорий. Согласно первой гипотезе, полный набор мини-хромосом (в случае спиротрих) или небольших хромосом (в случае некоторых других инфузорий) Ма ядра, необходимый для нормальной жизнедеятельности клетки, ассоциирован вместе в так называемый субнуклеус, который представляет собой структурную субъединицу Ма. Таких субнуклеусов в Ма может быть несколько, и в процессе деления Ма именно субнуклеусы, а не отдельные мини-хромосомы каким-то образом распределяются между дочерними ядрами (Nanney, Preparata, 1979).

В настоящее время субнуклеусная гипотеза сегрегации генетического материала при делении Ма инфузорий устарела и представляет интерес только с исторической точки зрения. Дело в том, что у тетрахимен было обнаружено явление так называемой генетической рассортировки аллелей, при которой в исходно гетерозиготных клеточных линиях этих инфузорий через некоторое количество делений после конъюгации появляются особи, содержащие только одну аллель некоторых генов (Merriam, Bruns, 1988; Longcor et al., 1996). Этот результат объясняется случайным распределением генных аллелей при делении Ма и, следовательно, случайным распределением мини-хромосом, в которых содержатся эти аллели. Тем не менее в действительности при делении инфузорий не происходит потери жизненно важных генов Ма, приводящей к гибели клеток. Вместе с тем феномен старения клонов у ресничных простейших также общезвестен.

Согласно второй гипотезе, объясняющей как сестринские хромосомные ДНК распределяются в дочерние Ма, — репликативной гипотезе, — баланс копий различных мини-хромосом в случае их недостатка в дочерних Ма достигается с помощью дополнительных раундов репликации соответствующих мини-хромосом (Preer, Preer, 1979). Дополнительные раунды репликации ДНК в Ма действительно были обнаружены у тетрахимен (Борхсениус и др., 1977; Cleffmann, 1975) и парамеций (Berger, 1982). При этом полагали, что избыток хромосом того или иного класса может удаляться из ядра, например, в ходе экстрезии хроматина из Ма (Doerder et al., 1975; Cleffmann, 1980). Однако оставалось неясным, каким образом клетка может «считать» количество мини-хромосом того или иного типа в Ма. При этом были получены данные, которые свидетельствовали как в пользу существования механизма активного контроля количества копий генов в Ма (данные о репликации рибосомальной ДНК у *Tetrahymena thermophila* и результаты анализа строения сайтов инициации репликации в мини-хромосомах, кодирующих рРНК; Larson et al., 1991), так и против этой гипотезы (данные о постоянстве в ряду поколений числа копий ДНК фага лямбда, инъекционной в Ма парамеций; Kim et al., 1992).

Результаты работы Сковородкина и соавторов (Skovorodkin et al., 2001b) по изучению механизма контроля репликации мини-хромосом, несущих ген $\alpha 1$ -тубулина, подтвердили отсутствие активного контроля числа копий мини-хромосом в Ма *S. lemnae*. Во-первых, оказалось, что в трансформированных стилонихиях, отличаю-

щихся от нативных особей большим числом копий гена $\alpha 1$ -тубулина, меченного специфической олигонуклеотидной вставкой, число собственных мини-хромосом, содержащих этот ген, не уменьшилось. При активном контроле числа копий генов в Ма увеличение в этом ядре в несколько (до десяти) раз количества мини-хромосом, практически идентичных нативной мини-хромосоме этого же типа, не могло бы остаться «не замеченным» клеткой. Во-вторых, трансформирующие векторы, лишенные 5'- и 3'-некодирующих участков, и векторы, в которых эти участки были заменены прокариотными последовательностями ДНК, после введения в Ма должны были со временем исчезнуть из ядра, поскольку они не содержат никаких участков ДНК, свойственных нативным мини-хромосомам *S. lemnae*. Однако в действительности оказалось, что уменьшения числа копий этих молекул ДНК в трансформированных клетках не происходит (Skovorodkin et al., 2001b). Исходя из полученных данных можно сделать вывод о том, что в Ма *S. lemnae* активный сиквенс-специфический контроль количества копий мини-хромосом отсутствует.

Если это предположение верно, тогда необходимо объяснить, почему случайное распределение мини-хромосом по ядрам дочерних клеток не приводит к быстрому исчезновению некоторых генов и последующей гибели инфузорий. По-видимому, должен существовать механизм, обеспечивающий равномерное распределение генетического материала в делящемся Ма. Известно, что перед делением гантелевидного Ма стилонихий форма этого ядра изменяется — оно становится сферическим. При этом даже на светооптическом уровне можно наблюдать перемешивание содержимого ядра (Kimball, Prescott, 1962; Ammermann, 1971; Райков, Аммерманн, 1976). Возможно, такое перемешивание содержимого ядра как-то связано с механизмом, обеспечивающим передачу в дочерние Ма по одинаковому количеству соответствующих мини-хромосом (Kimball, Prescott, 1962; Bardele, 1969; Ammermann, 1971; Райков, Аммерманн, 1976). К сожалению, детали этого механизма до сих пор неизвестны.

Экспериментальный подход, основанный на трансформации клеток стилонихий линейными конструкциями ДНК, маркированными олигонуклеотидными вставками, позволил также получить интересные данные о регуляции транскрипции у *S. lemnae* (Skovorodkin et al., 2001a; Pimenov et al., 2002; Zassoukhina et al., 2002; Райхель, 2003). Так, в мини-хромосоме, несущей ген $\alpha 1$ -тубулина, был обнаружен ряд нуклеотидных последовательностей (последовательность ТАТССАТТСААА, начало которой расположено на 47 п.н. левее точки начала транскрипции; последовательность ТАААТА, начало которой расположено на 28 п.н. левее точки начала транскрипции; последовательность АТТАТАА, начало которой расположено на 5 п.н. левее точки начала транскрипции), мутации в которых приводили к достоверному снижению синтеза мРНК в Ма (Skovorodkin et al., 2001a; Pimenov et al., 2002; Zassoukhina et al., 2002; Райхель, 2003). При этом замены нуклеотидов в участках между указанными последовательностями ДНК мини-хромосомы, несущей ген $\alpha 1$ -тубулина, не приводили к заметно-му изменению интенсивности синтеза мРНК.

Дальнейший анализ 5'-нетранскрибируемой области $\alpha 1$ -тубулиновой мини-хромосомы *S. lemnae* показал, что участки этой области, представленные последовательностями ТАТССАТТСААА, ТАААТА и АТТАТАА,

соответствуют следующим классическим элементам промотора других эукариот: 1) СААТ-боксу, 2) ТАТА-боксу и 3) инициатору транскрипции (Pimenov et al., 2002; Райхель, 2003).

Основываясь на данных литературы о строении классического эукариотного промотора и нуклеотидном составе консервативных регуляторных элементов в мини-хромосомах *S. lemnae*, можно достаточно точно предположить, где эти последовательности локализованы в гене $\alpha 1$ -тубулина (Райхель, 2003). При этом получается, что СААТ-бокс $\alpha 1$ -тубулиновой мини-хромосомы *S. lemnae*, имеющий нуклеотидный состав САТАТ, расположен между -44 и -50 п.н., а ТАТА-бокс, имеющий состав ТАААТА, расположен между -22 и -29 п.н. Инициатор транскрипции, представленный нуклеотидами АТТАТАА, занимает позицию от $+2$ до -5 п.н.

Ранее СААТ-бокс был обнаружен в результате сравнения нуклеотидных последовательностей в 6 генах *Ma Tetrahymena thermophila*, в одном гене *T. pigmentosa* и в гене $\alpha 1$ -тубулина *Stylonychia lemnae* (Brunk, Sadler, 1990). При этом для СААТ-боксов этих инфузорий была определена следующая консенсусная последовательность: $5'$ -ТАТССААТТССАА- $3'$. В еще одной работе, в которой анализировали 66 макронуклеарных генов других инфузорий, СААТ-боксы идентифицировали по определенной для некоторых эукариот консенсусной последовательности $5'$ -GG(T/c)СААТСТ- $3'$ (Hoffmann et al., 1995). В результате были выявлены СААТ-подобные последовательности в 19 из 66 исследованных макронуклеарных генов инфузорий (Hoffmann et al., 1995). Интересно, что при сравнении нуклеотидных последовательностей 9 макронуклеарных генов *Euplotes crassus* был обнаружен СААТ-бокс с последовательностью $5'$ -GAGССААТССАА- $3'$ только в одном из этих генов (Ghosh et al., 1994). При этом поиск СААТ-боксов *E. crassus* проводился с использованием консенсусной последовательности $5'$ -ТАТССААТССАА- $3'$, где R обозначает пуриновые основания. В целом можно сделать вывод о том, что сравнительно-молекулярный анализ нуклеотидных последовательностей СААТ-боксов у разных видов инфузорий все же позволяет выявить консервативный мотив ССААТ в АТ-богатом $5'$ -некодирующем участке генов этих простейших.

СААТ-бокс является типичным для эукариот элементом кор-промотора (Жимулев, 2002). При этом его функция заключается в контроле первоначального связывания РНК-полимеразы II с промотором, что в свою очередь обеспечивает правильное позиционирование прединициационного комплекса транскрипции на соответствующем сегменте молекулы ДНК. Известно, что если промотор содержит только инициатор транскрипции и отсутствуют другие основные транскрипционные факторы, очищенная РНК-полимераза II инициирует транскрипцию малоэффективно (Cargamo et al., 1991). Некоторые другие данные, например снижение эффективности транскрипции в результате сайт-специфических мутаций последовательностей ДНК, расположенных в определенных областях промотора, также подтверждают предположение о том, что СААТ-бокс модулирует эффективность транскрипции у эукариот (McKnight, Kingsbury, 1982; Graves et al., 1986; Barberis et al., 1987). По-видимому, у *S. lemnae* СААТ-бокс в гене, кодирующем $\alpha 1$ -тубулин, также играет роль вспомогательного элемента кор-промотора, усиливающего эффективность транскрипции этого гена. Это предположение

подтверждено в экспериментах по котрансфекции *S. lemnae* векторам, содержащими мутации в области СААТ-боксов. Так, было показано, что разрушение этого элемента промотора снижает эффективность транскрипции, хотя и не в такой мере, как, например, при удалении инициатора транскрипции (Skovorodkin et al., 2001a; Pimenov et al., 2002; Zassoukhina et al., 2002; Райхель, 2003).

Результаты анализа последовательностей ДНК мини-хромосом *Ma* инфузорий-спиротрих позволили сформулировать некоторые предположения о локализации ТАТА-боксов или по крайней мере ТАТА-подобных последовательностей в различных генах этих простейших (Greslin et al., 1988; Wefes, Lipps, 1990; Gaunitz et al., 1992; Hoffman et al., 1995). К сожалению, полученные выводы оказались не слишком правдоподобными. Так, по результатам работы Вефеса и Липса (Wefes, Lipps, 1990) было сделано предположение о том, что в гене гистона H4K *S. lemnae* имеется ТАТА-бокс в положении -19 п.н. относительно точки начала трансляции. При этом точка начала транскрипции в упомянутой работе не была определена. Это предположение представляется маловероятным, поскольку консенсусные последовательности ТАТА-боксов, так же как и другие АТ-богатые последовательности, обычно располагаются на другом, совершенно определенном расстоянии относительно точки начала транскрипции (обычно в районе от -5 до -30 п.н.) практически у всех исследованных эукариот. Исключение пока составляют только дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, у которых ТАТА-бокс находится в участке между -40 и -120 п.н. относительно точки начала транскрипции (Li et al., 1994; Smale, Kadonaga, 2003).

В работах, посвященных анализу нуклеотидных последовательностей промотора гена $\alpha 1$ -тубулина *S. lemnae*, предполагалось, что ТАТА-бокс локализован в самых разных положениях относительно точки начала трансляции: -164 , -139 и -40 п.н. (Helftenbein, 1985); -40 п.н. (Helftenbein, Muller, 1988); -145 п.н. (Helftenbein et al., 1989); -125 п.н. (Steinbrueck, 1990). Сразу отметим, что в дальнейшем все эти предположения не были экспериментально подтверждены (Райхель, 2003). Только теоретические предположения о локализации ТАТА-боксов в генах гистона H4G, а также в генах $\alpha 2$ - и $\beta 2$ -тубулина у *S. lemnae* (Steinbrueck, 1990; Wefes, Lipps, 1990) нашли подтверждение в ходе последующих экспериментальных исследований с использованием мутантных конструкций ДНК (Pimenov et al., 2002; Райхель, 2003).

Причина столь частых расхождений между расчетными предположениями и экспериментальными доказательствами локализации ТАТА-боксов в соответствующих генах спиротрих состоит в том, что $5'$ -некодирующий участок этих генов очень богат нуклеотидами А и Т и поэтому ТАТА-подобные мотивы встречаются в рассматриваемых участках довольно часто. С другой стороны, исследователи, ориентирующиеся на строго фиксированную структуру консенсусной последовательности ТАТА-боксов — ТАТАА, получают заниженные результаты при оценке распространенности этого элемента промотора в генах инфузорий (Hoffman et al., 1995). Согласно современным представлениям, консенсусная последовательность ТАТА-боксов может варьировать в широких пределах (Hahn et al., 1989; Singer et al., 1990; Wobbe Struhl, 1990; Zenzie-Gregory et al., 1993; Patikoglou et al., 1999). Поэтому с достаточной уверенностью можно искать ТАТА-бокс только в генах, в которых

определена точка инициации транскрипции. При этом следует учитывать, что ТАТА-бокс располагается на совершенно определенном расстоянии от этой точки — в области от –25 до –30 п.н. Определив таким образом район, в котором может находиться искомый регуляторный элемент, следует далее искать в нем последовательность, состоящую из пяти-шести нуклеотидов А и Т. В частности, придерживаясь именно этих правил и был экспериментально обнаружен ТАТА-бокс в генах $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, $\beta 1$ - и $\beta 2$ -тубулина (Райхель, 2003). Если ориентироваться на положение ТАТА-бокса относительно точки начала транскрипции и на сходство у разных генов последовательностей ДНК, расположенных в этой области, то оказывается, что этот регуляторный элемент имеет консенсусную последовательность ТААТА у тубулинов $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - и $\beta 2$ - и ТАТАА у $\beta 1$ -тубулина (Райхель, 2003).

Экспериментально у инфузорий был обнаружен еще один важнейший элемент типичного кор-промотора эукариот — инициатор транскрипции, который впервые был выявлен у *S. lemnae*. Эксперименты по трансформации стилонихий показали, что удаление или замена в гене $\alpha 1$ -тубулина последовательности ДНК, расположенной в области точки начала транскрипции, приводит к значительному снижению эффективности транскрипции этого гена (Pimenov et al., 2002; Zassoukhina et al., 2002). В последующей работе в результате сравнения последовательностей ДНК, окружающих точку начала транскрипции, у различных генов *S. lemnae* и других эукариот было подтверждено присутствие типичного для эукариот инициатора транскрипции у стилонихий. Консенсусная последовательность инициатора транскрипции в генах $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -тубулина *S. lemnae* представлена гептануклеотидом АТТАТАА, в гене $\beta 1$ -тубулина — ГТАТТАА, а в гене $\beta 2$ -тубулина — ТАТАТАА. Все эти гептануклеотиды соответствуют типичной консенсусной последовательности инициатора транскрипции других эукариот, которую можно описать формулой Y₂YANT/A₂Y₂, где Y — любой пиримидиновый нуклеотид, а N — любой нуклеотид (Smale, Baltimore, 1989; Jahvahery et al., 1994; Lo, Smale, 1996).

Заключение

Изучение ядерного диморфизма инфузорий, которое на протяжении многих десятилетий прошлого столетия традиционно велось преимущественно протозоологами, в начале XXI в. привело к появлению научного направления — исследование мини-хромосом и других небольших хромосом ресничных простейших. Это направление исследований возникло на стыке классической протистологии и современной клеточной и молекулярной биологии, главным образом благодаря двум обстоятельствам: 1) широкому использованию современных методов исследования, позволившим идентифицировать эти хромосомы в необычном ядерном аппарате инфузорий; 2) удачному подбору подходящих модельных объектов для углубления анализа хромосом этих простейших. Среди этих объектов исследования особенно перспективными оказались инфузории-спиротрихи, преимущественно *Stylonychia lemnae*, в Ма которых были открыты моногенные и олигогенные мини-хромосомы. Последние образуются в жизненном цикле спиротрих в результате сложного процесса дифференцировки зачатков Ма после конъюгации или автогамии инфузорий. При этом в

развивающихся Ма происходят: 1) делеция большинства элементов исходного генома зачатков Ма (т. е. генома синкарионов, из которых образуются эти зачатки), включая некоторые целые хромосомы; 2) многократное умножение путем амплификации оставшейся части генома. Также не исключено, что сохранившиеся в Ма сегменты микронуклеарных ДНК перераспределяются по разным хромосомам.

Разносторонние исследования мини-хромосом *S. lemnae* позволили обогатить наши представления о таких ключевых биологических процессах и явлениях, как репликация хромосомных ДНК, генная амплификация, регуляция генной активности, упаковка хромосомного материала в интерфазе, поведение ацентрических хромосом при делении ядра и многие другие. Необходимо также отметить, что, за исключением отсутствия центромерной последовательности нуклеотидов, во всех остальных отношениях мини-хромосомы *S. lemnae* и некоторых других спиротрих представляют собой естественные модели «минимально возможных» эукариотных хромосом. Так, большое число мини-хромосом *S. lemnae* содержит всего один ген, который обрамлен небольшими нетранскрибируемыми последовательностями нуклеотидов и короткими теломерами. При этом все или почти все гены мини-хромосом демонстрируют высокую транскрипционную активность, т. е. «молчащих» мини-хромосом у *S. lemnae* практически нет.

Экспериментально доказано, что 5'-нетранслируемые области, по крайней мере тех мини-хромосом, в которых локализованы гены $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -тубулина, содержат классические элементы эукариотного промотора: СА-АТ-бокс, ТАТА-бокс и инициатор транскрипции. Вместе с тем в мини-хромосомах не было обнаружено специфических для инфузорий регуляторных последовательностей, которые контролируют репликацию ДНК. Необходимо также отметить, что исходя из полученных к настоящему времени данных можно предположить, что в Ма *S. lemnae* отсутствует активный сиквенс-специфический контроль количества копий мини-хромосом. Интересно, что в мини-хромосомах спиротрих почти не встречаются повторяющиеся последовательности, которые у других эукариот играют существенную роль в формировании гетерохроматина. Получены убедительные подтверждения гипотезы, согласно которой в теломерах спиротрих локализируются точки инициации репликации ДНК мини-хромосом.

Обращает на себя внимание тот факт, что простой сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей ДНК мини-хромосом Ма спиротрих, которым увлекаются многие исследователи, и поиск на основе этого анализа в ДНК мини-хромосом уже известных структурных элементов хромосом других эукариот далеко не всегда дают однозначные положительные результаты. Такой теоретический анализ последовательности оснований в мини-хромосоме следует рассматривать только как основу для планирования дальнейшей экспериментальной работы, основанной, например, на использовании клонированных конструкций ДНК, содержащих мутации в анализируемых областях мини-хромосомы.

Из представленного обзора следует, что к настоящему времени молекулярная организация отдельных мини-хромосом *S. lemnae* неплохо исследована. Однако остаются нерешенными многие проблемы, связанные с определением общих принципов структурной организации и функционирования генома этого модельного вида

инфузорий-спиротрих. Успехам исследований в этой области в немалой степени мог бы способствовать специальный геномный проект, имеющий целью определение и сравнительный анализ последовательностей оснований всех хромосомных ДНК Ма и Ми *S. lemnae*.

Остается актуальным и вопрос о том, каким образом в жизненном цикле спиротрих поддерживается на постоянном уровне число копий различных мини-хромосом Ма. Приходится также признать, что пока остается непонятным, как без участия кинетохоров и микротрубочек оформленного веретена деления мини-хромосомы расходятся в делящихся Ма этих инфузорий. Изучение этого процесса могло бы способствовать пониманию того, как вообще возник митоз у эукариот, поскольку деление Ма *S. lemnae*, возможно в ряде отношений, моделирует сегрегацию генетического материала у первичных эукариот, у которых еще не сформировался митотический аппарат из микротрубочек и кинетохоров.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 03-04-48505 и 04-04-49209), Немецкого фонда научных исследований (фонд DFG, проект Am 26/31-1) и Немецкого фонда академических обменов (фонд DAAD, проект 325/lin).

Список литературы

- Борхсенус С. Н., Белозерская Н. А., Меркулова Н. А., Ирлина И. С., Воробьев В. И. 1977. Возможность неоднократной репликации части ядерной ДНК инфузории *Tetrahymena* в течение одного S-периода. Молекуляр. биол. 11 (1): 171—180.
- Винникова Н. В. 1974. Ультраструктурные изменения макрохромосом *Dileptus anser* О. Ф. М. во время конъюгации. Acta protozool. 13: 97—107.
- Догель В. А. 1981. Зоология беспозвоночных. М.: Высш. шк. 606 с.
- Жимулев И. Ф. 2002. Общая и молекулярная генетика. Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та. 459 с.
- Осипов Д. В. 1981. Проблемы гетероморфизма ядер у одноклеточных организмов. Л.: Наука. 167 с.
- Райков И. Б. 1978. Ядро простейших. Морфология и эволюция. Л.: Наука. 328 с.
- Райков И. Б. 1989. Ядерный геном простейших. В кн.: Организация генома. М.: Наука. 110—154.
- Райков И. Б. 1992. Ядерная дифференцировка и гетероморфизм ядер у простейших. Цитология. 34 (7): 3—16.
- Райков И. Б., Аммерманн Д. 1976. Новые успехи в изучении макрохромосом инфузорий. В кн.: Кариология и генетика простейших. Л.: Наука. 1: 64—90.
- Райхель И. Б. 2003. Регуляторные участки ДНК в минихромосомах инфузории *Stylonychia lemnae*, несущих гены α - и β 2-тубулина: Автореф. канд. дис. СПб.: СПб. гос. политех. ун-т. 26 с.
- Сергеева Г. И. 1977. О структуре хроматина макрохромосом инфузории *Bursaria truncatella*. Цитология. 19 (7): 3—16.
- Скарлато С. О. 1977. Ультраструктура ядерного аппарата инфузории *Stentor coeruleus*. Цитология. 19 (5): 478—483.
- Скарлато С. О. 1978. Электронномикроскопическое исследование изменения макрохромосом инфузории *Stentor coeruleus* в процессе конъюгации. Цитология. 20 (6): 607—611.
- Aigner S., Cech T. R. 2004. The *Euplotes* telomerase subunit p43 stimulates enzymatic activity and processivity *in vitro*. RNA. 10: 1108—1118.
- Alonso P. 1978. Les chromosomes polytènes des ciliés. Ann. Biol. 17: 369—386.
- Ammermann D. 1964. Riesenchromosomen in der Makronucleusanlage des Ciliaten *Stylonychia* spec. Naturwissenschaften. 51: 249.
- Ammermann D. 1965. Cytologische und genetische Untersuchungen an dem Ciliaten *Stylonychia mytilus* Ehrenberg. Arch. Protistenk. 108: 109—152.
- Ammermann D. 1970. The macronucleus of the ciliate *Stylonychia mytilus*; its nucleic acid synthesis and its function. Exp. Cell Res. 61: 6—12.
- Ammermann D. 1971. Morphology and development of the macronuclei of the ciliates *Stylonychia mytilus* and *Euplotes aediculatus*. Chromosoma. 33: 209—238.
- Ammermann D. 1987. Giant chromosomes in ciliates. Results Probl. Cell Differ. 14: 59—67.
- Ammermann D. 1990. The contribution of hypotrichous ciliates to our understanding of molecular biology and evolution of ciliates. Zool. Sci. Suppl. 7: 13—22.
- Ammermann D., Hellmer K. H., Zassoukhina I., Skovorodkin I. 2003. Response to X-ray- and cis Pt-induced DNA damage in *Stylonychia lemnae* (Ciliata, Protozoa). Eur. J. Protistol. 39: 223—230.
- Ammermann D., Schlegel M. 1983. Characterization of two sibling species of the genus *Stylonychia* (Ciliata, Hypotricha): *S. mytilus* Ehrenberg, 1838 and *S. lemnae* n. sp. I. Morphology and reproductive behavior. J. Protozool. 30: 290—294.
- Ammermann D., Steinbruck G., von Berger L., Hennig W. 1974. The development of the macronucleus in the ciliated protozoan *Stylonychia mytilus*. Chromosoma. 45: 401—429.
- Ardell D. H., Lozupone C. A., Landweber L. F. 2003. Polymorphism, recombination and alternative unscrambling in the DNA polymerase alpha gene of the ciliate *Stylonychia lemnae* (Alveolata; class Spirotrichea). Genetics. 165: 1761—1777.
- Barberis A., Superti-Furga G., Busslinger M. 1987. Mutually exclusive interaction of the CCAAT-binding factor and of a displacement protein with overlapping sequences of a histone gene promoter. Cell. 50: 347—359.
- Bardele C. F. 1969. *Acineta tuberosa*. II. The distribution of microtubules in the macronucleus during asexual reproduction. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 93: 93—104.
- Berger J. D. 1982. Effects of gene dosage on protein synthesis rate in *Paramecium tetraurelia*. Implications for regulation of cell mass, DNA content and the cell cycle. Exp. Cell Res. 141: 261—275.
- Brunk C. F., Sadler L. A. 1990. Characterization of the promoter region of *Tetrahymena* genes. Nucl. Acids Res. 18: 323—329.
- Carcamo J., Buckbinder L., Reinberg D. 1991. The initiator directs the assembly of a transcription factor IID-dependent transcription complex. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 88: 8052—8056.
- Cavalcanti A. R., Dunn D. M., Weiss R., Herrick G., Landweber L. F., Doak T. G. 2004a. Sequence features of *Oxytricha trifallax* (class Spirotrichea) macronuclear telomeric and subtelomeric sequences. Protist. 155: 311—322.
- Cavalcanti A. R., Stover N. A., Orecchia L., Doak T. G., Landweber L. F. 2004b. Coding properties of *Oxytricha trifallax* (*Sterkiella histriomuscorum*) macronuclear chromosomes: analysis of a pilot genome project. Chromosoma. 113: 69—76.
- Cleffmann G. 1975. Amount of DNA produced during extra S phases in *Tetrahymena*. J. Cell Biol. 66: 204—209.
- Cleffmann G. 1980. Chromatin elimination and the genetic organization of the macronucleus in *Tetrahymena thermophila*. Chromosoma. 78: 313—325.
- Conzelmann K. K., Helftenbein E. 1987. Nucleotide sequence and expression of two beta-tubulin genes in *Stylonychia lemnae*. J. Mol. Biol. 198: 643—653.
- Doerder F. P., Lief J. H., Doerder L. E. 1975. A corrected table for macronuclear assortment in *Tetrahymena pyriformis*, syn-gen 1. Genetics. 80: 263—265.
- Elsevier S. M., Lipps H. J., Steinbruck G. 1978. Histone genes in macronuclear DNA of the ciliate *Stylonychia mytilus*. Chromosoma. 69: 291—306.
- Foissner W., Berger H. 1999. Identification and ontogenesis of the *nomen nudum* Hypotrichs (Protozoa: Ciliophora) *Oxytricha nova* (= *Sterkiella nova* sp. n.) and *O. trifallax* (= *S. histriomuscorum*). Acta protozool. 38: 215—248.

- Fokin S. I., Ossipov D. V. 1981. Generative nucleus control over cell vegetative functions in *Paramecium*. *Acta protozool.* 20 : 51—73.
- Garnier O., Serrano V., Duhaucourt S., Meyer E. 2004. RNA-mediated programming of developmental genome rearrangements in *Paramecium tetraurelia*. *Mol. Cell Biol.* 24 : 7370—7379.
- Gaunitz C., Witte H., Gaunitz F. 1992. Primary structure of a gene-sized DNA encoding calmodulin from the hypotrichous ciliate *Stylonychia lemnae*. *Gene.* 119 : 191—198.
- Ghosh S., Jaraczewski J. W., Klobutcher L. A., Jahn C. L. 1994. Characterization of transcription initiation, translation initiation, and poly(A) addition sites in the gene-sized macronuclear DNA molecules of *Euplotes*. *Nucl. Acids Res.* 22 : 214—221.
- Gil R., Alonso P., Perez-Silva J. 1972. Ultrastructure of the macronuclear anlage in *Stylonychia mytilus*. *Exp. Cell Res.* 72 : 509—518.
- Graves B. J., Johnson P. F., McKnight S. L. 1986. Homologous recognition of a promoter domain common to the MSV LTR and the HVS tk gene. *Cell.* 44 : 565—576.
- Gray J. T., Celandier D. W., Price C. M., Cech T. R. 1991. Cloning and expression of genes for the *Oxytricha* telomere-binding protein: specific subunit interactions in the telomeric complex. *Cell.* 67 : 807—814.
- Grell K. G. 1953. Die Konjugation von *Ephelota gemmipara* R. Hertwig. *Arch. Protistenk.* 98 : 287—326.
- Greslin A. F., Loukin S. H., Oka Y., Prescott D. M. 1988. An analysis of the macronuclear actin genes of *Oxytricha*. *DNA.* 7 : 529—536.
- Greslin A. F., Prescott D. M., Oka Y., Loukin S. H., Chappell J. C. 1989. Reordering of nine exons is necessary to form a functional actin gene in *Oxytricha nova*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 86 : 6264—6268.
- Hahn S., Buratowski S., Sharp P. A., Guarente L. 1989. Yeast TATA-binding protein TFIID binds to TATA elements with both consensus and nonconsensus DNA sequences. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 86 : 5718—5722.
- Helftenbein E. 1985. Nucleotide sequence of a macronuclear DNA molecule coding for alpha-tubulin from the ciliate *Stylonychia lemnae*. Special codon usage: TAA is not a translation termination codon. *Nucl. Acids Res.* 13 : 415—433.
- Helftenbein E., Conzelmann K. K., Becker K. F., Fritzenschaf H. 1989. Regulatory structure of gene expression, DNA-replication and DNA-rearrangement macronuclear genes of *Stylonychia lemnae*, a hypotrichous ciliate. *Eur. J. Protistol.* 25 : 158—167.
- Helftenbein E., Muller E. 1988. Both alpha-tubulin genes are transcriptionally active in *Stylonychia lemnae*. *Curr. Genet.* 13 : 425—432.
- Hoffman D. C., Anderson R. C., DuBois M. L., Prescott D. M. 1995. Macronuclear gene-sized molecules of hypotrichs. *Nucl. Acids. Res.* 23 : 1279—1283.
- Jahn C. L., Klobutcher L. A. 2002. Genome remodeling in ciliated protozoa. *Ann. Rev. Microbiol.* 56 : 489—520.
- Javahery R., Khachi A., Lo K., Zenie-Gregory B., Smale S. T. 1994. DNA sequence requirements for transcriptional initiator activity in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 14 : 116—127.
- Jonsson F., Steinbruck G., Lipps H. J. 2001. Both subtelomeric regions are required and sufficient for specific DNA fragmentation during macronuclear development in *Stylonychia lemnae*. *Genome Biol.* 2 : RESEARCH0005. 1—5. 11.
- Kaney A. R., Speare V. J. 1992. A genetic screen for vegetative gene expression in the micronucleus of *Tetrahymena thermophila*. *J. Protozool.* 39 : 323—328.
- Karrer K. M. 1986. The nuclear DNAs of holotrichous ciliates. In: *The molecular biology of ciliated protozoa*. New York: Acad. Press. 85—110.
- Kim C. S., Preer J. R., Jr., Polisky B. 1992. Bacteriophage lambda DNA fragments replicate in the *Paramecium* macronucleus: absence of active copy number control. *Develop. Genet.* 13 : 97—102.
- Kimball R. F., Prescott D. M. 1962. Deoxyribonucleic acid synthesis and distribution during growth and amitosis of the macronucleus of *Euplotes*. *J. Protozool.* 9 : 88—92.
- Klobutcher L. A., Prescott D. M. 1986. The special case of the hypotrichs. In: *The molecular biology of ciliated protozoa*. New York: Acad. Press. 111—154.
- Klobutcher L. A., Swanton M. T., Donini P., Prescott D. M. 1981. All gene-sized DNA molecules in four species of hypotrichs have the same terminal sequence and an unusual 3' terminus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 78 : 3015—3019.
- Kloetzel J. A. 1970. Compartmentalization of the developing macronucleus following conjugation in *Stylonychia* and *Euplotes*. *J. Cell Biol.* 47 : 395—407.
- Kraut H., Lipps H. J., Prescott D. M. 1986. The genome of hypotrichous ciliates. *Int. Rev. Cytol.* 99 : 1—28.
- Kreyenberg H., Witte H., Ammermann D. 1998. A comparison of overamplified macronuclear chromosomes in the ciliate *Stylonychia lemnae*. *Eur. J. Protistol.* 34 : 29—38.
- Landweber L. F., Kuo T. C., Curtis E. A. 2000. Evolution and assembly of an extremely scrambled gene. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 97 : 3298—3303.
- Larson D. D., Umthun A. R., Shaiu W. L. 1991. Copy number control in the *Tetrahymena* macronuclear genome. *J. Protozool.* 38 : 258—263.
- Lescasse R., Grisvard J., Fryd G., Fleury-Aubusson A., Baroin-Tourancheau A. 2005. Proposed function of the accumulation of plasma membrane-type Ca²⁺-ATPase mRNA in resting cysts of the ciliate *Sterkiella histriomuscorum*. *Eukaryot. Cell.* 4 : 103—110.
- Li Y., Flanagan P. M., Tschochner H., Kornberg R. D. 1994. RNA polymerase II initiation factor interactions and transcription start site selection. *Science.* 263 : 805—807.
- Lipps H. J., Nock A., Riewe M., Steinbruck G. 1978. Chromatin structure in the macronucleus of the ciliate *Stylonychia mytilus*. *Nucl. Acids Res.* 5 : 4699—4709.
- Lo K., Smale S. T. 1996. Generality of a functional initiator consensus sequence. *Gene.* 182 : 13—22.
- Longcor M. A., Wickert S. A., Chau M.-F., Orias E. 1996. Co-assortment of genetic loci during macronuclear division in *Tetrahymena thermophila*. *Eur. J. Protistol.* 32 : 85—89.
- Lozupone C. A., Knight R. D., Landweber L. F. 2001. The molecular basis of nuclear genetic code change in ciliates. *Curr. Biol.* 11 : 65—74.
- Lu L., Ng S. F. 1991. Somatic function of the micronucleus of *Stylonychia mytilus* during asexual propagation. *Eur. J. Protistol.* 27 : 1—98.
- Lynn D. H., Small E. B. 2002. Phylum Ciliophora. In: *An illustrated guide to the Protozoa*. Lawrence, Kansas: Society of Protozoologists. 371—656.
- Maercker C., Kortwig H., Lipps H. J. 1999. Separation of micronuclear DNA of *Stylonychia lemnae* by pulsed-field electrophoresis and identification of a DNA molecule with a high copy number. *Genome Res.* 9 : 654—661.
- Maercker C., Lipps H. J. 1993. Analysis of the subtelomeric regions of macronuclear gene-sized DNA molecules of the hypotrichous ciliate *Stylonychia lemnae*: implications for the DNA fragmentation process during macronuclear development? *Develop. Genet.* 14 : 378—384.
- McKnight S. L., Kingsbury R. 1982. Transcriptional control signals of a eukaryotic protein-coding gene. *Science.* 217 : 316—324.
- Merriam E. V., Bruns P. J. 1988. Phenotypic assortment in *Tetrahymena thermophila*: assortment kinetics of antibiotic-resistance markers, tsA, death, and the highly amplified rDNA locus. *Genetics.* 120 : 389—395.
- Meyer E., Beisson J. 2005. Epigenetics: *Paramecium* as a model system. *Med. Sci. (Paris).* 21 : 377—383.
- Meyer F., Schmidt H. J., Plumper E., Hasilik A., Mersmann G., Meyer H. E., Engstrom A., Heckmann K. 1991. UGA is translated as cysteine in pheromone 3 of *Euplotes octocarinatus*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 88 : 3758—3761.
- Meyers G., Helftenbein E. 1988. Transfection of the hypotrichous ciliate *Stylonychia lemnae* with linear DNA vectors. *Gene.* 63 : 31—40.
- Mollenbeck M., Gavin M. C., Klobutcher L. A. 2004. Evolution of programmed ribosomal frameshifting in the TERT genes of *Euplotes*. *J. Mol. Evol.* 58 : 701—711.

- Nanney D. L., Preparata R. M. 1979. Genetic evidence concerning the structure of the *Tetrahymena thermophila* macronucleus. *J. Protozool.* 26 : 2—9.
- Ng S. F. 1986. The somatic function of the micronucleus of ciliated protozoa. In: *Progress in protistology*. Bristol: Biopress. 1 : 215—286.
- Nock A. 1981. RNA and macronuclear transcription in the ciliate *Stylonychia mytilus*. *Chromosoma.* 83 : 209—220.
- Patikoglou G. A., Kim J. L., Sun L., Yang S. H., Kodadek T., Burley S. K. 1999. TATA element recognition by the TATA box-binding protein has been conserved throughout evolution. *Genes Develop.* 13 : 3217—3230.
- Pimenov A., Zassoukhina I. B., Ammermann D., Skovorodkin I. N. 2002. Characterization of transcription initiator in alpha and beta tubulin genes of *Stylonychia lemnae*. In: 21 Jahrestagung der deutschen Gesellschaft fuer Protozoologie. Konstanz. 35.
- Postberg J., Alexandrova O., Cremer T., Lipps H. J. 2005. Exploiting nuclear duality of ciliates to analyse topological requirements for DNA replication and transcription. *J. Cell Sci.* 118 : 3973—3983.
- Preer J. R., Preer L. B. 1979. The size of macronuclear DNA and its relationship to models for maintaining genic balance. *J. Protozool.* 26 : 14—18.
- Prescott D. M. 1994. The DNA of ciliated protozoa. *Microbiol. Rev.* 58 : 233—267.
- Prescott D. M. 1997. Origin, evolution, and excision of internal elimination segments in germline genes of ciliates. *Curr. Opin. Genet. Develop.* 7 : 807—813.
- Prescott D. M. 1998. Invention and mystery in hypotrich DNA. *J. Euk. Microbiol.* 45 : 575—581.
- Prescott D. M. 2000. Genome gymnastics: unique modes of DNA evolution and processing in ciliates. *Nat. Rev. Genet.* 1 : 191—198.
- Prescott D. M., Bostock C. J., Murti K. G., Lauth M. R., Gamow E. 1971. DNA of ciliated protozoa. I. Electron microscopic and sedimentation analyses of macronuclear and micronuclear DNA of *Stylonychia mytilus*. *Chromosoma.* 34 : 355—366.
- Prescott D. M., Prescott J. D., Prescott R. M. 2002. Coding properties of macronuclear DNA molecules in *Sterkiella nova* (*Oxytricha nova*). *Protist.* 153 : 71—77.
- Raikov I. B. 1972. Nuclear phenomena during conjugation and autogamy in ciliates. In: *Research in protozoology*. Oxford; New York: Pergamon Press. 4 : 7—289.
- Raikov I. B. 1982. The Protozoan nucleus. Morphology and evolution. In: *Cell biology monographs*. Wien; New York: Springer Verlag. 9 : 474 p.
- Raikov I. B. 1985. Primitive never-dividing macronuclei of some lower ciliates. *Int. Rev. Cytol.* 95 : 267—325.
- Raikov I. B. 1994a. The diversity of forms of mitosis in Protozoa: a comparative review. *Eur. J. Protistol.* 30 : 253—269.
- Raikov I. B. 1994b. The nuclear apparatus of some primitive ciliates, the karyorelictids: structural and divisional reorganization. *Boll. Zool.* 61 : 19—28.
- Raikov I. B. 1995. Structure and genetic organization of the polyploid macronucleus of ciliates: a comparative review. *Acta protozool.* 34 : 151—171.
- Raikov I. B. 1996. Nuclei of ciliates. In: *Ciliates as organisms*. Stuttgart; Jena; New York: Gustav Fisher Verlag. 221—242.
- Riley J. L., Katz L. A. 2001. Widespread distribution of extensive chromosomal fragmentation in ciliates. *Mol. Biol. Evol.* 18 : 1372—1377.
- Roth M., Prescott D. M. 1985. DNA intermediates and telomere addition during genome reorganization in *Euplotes crassus*. *Cell.* 41 : 411—417.
- Seegmiller A., Williams K. R., Herrick G. 1997. Two two-gene macronuclear chromosomes of the hypotrichous ciliates *Oxytricha fallax* and *O. trifallax* generated by alternative processing of the 81 locus. *Develop. Genet.* 20 : 348—375.
- Singler V. L., Wobbe C. R., Struhl K. 1990. A wide variety of DNA sequences can functionally replace a yeast TATA element for transcriptional activation. *Genes Develop.* 4 : 636—645.
- Skovorodkin I. N., Bollgong S., Ammermann D., Gunzl A. 1999. Stable transfection of the hypotrichous ciliate *Stylonychia lemnae* with tagged alpha 1 tubulin minichromosomes. *Eur. J. Protistol.* 35 : 70—80.
- Skovorodkin I. N., Zassoukhina I., Ammermann D., Guenzl A. 2001a. Characterization of the promoter region in alpha-1 tubulin gene of the hypotrichous ciliate *Stylonychia lemnae*. In: XI Intern. Congr. Protozool. Salzburg. 13.
- Skovorodkin I. N., Zassoukhina I., Hojak S., Ammermann D., Gunzl A. 2001b. Minichromosomal DNA replication in the macronucleus of the hypotrichous ciliate *Stylonychia lemnae* is independent of chromosome-internal sequences. *Chromosoma.* 110 : 352—359.
- Smale S. T., Baltimore D. 1989. The «initiator» as a transcription control element. *Cell.* 57 : 103—113.
- Smale S. T., Kadonaga J. T. 2003. The RNA polymerase II core promoter. *Ann. Rev. Biochem.* 72 : 449—479.
- Steinbrueck G. 1990. Recent advances in the study of ciliate genes. *Eur. J. Protistol.* 26 : 2—14.
- Swanton M. T., Greslin A. F., Prescott D. M. 1980. Arrangement of coding and non-coding sequences in the DNA molecules coding for rRNAs in *Oxytricha* sp. DNA of ciliated protozoa. *Chromosoma.* 77 : 203—215.
- Tam L. W., Ng S. F. 1987. Genetic analysis of heterocaryons in search of active micronuclear genes in stomatogenesis of *Paramecium tetraurelia*. *Eur. J. Protistol.* 23 : 43—50.
- Tartar V. 1961. The biology of *Stentor*. New York; Paris: Pergamon Press, 413 p.
- Tausta S. L., Klobutcher L. A. 1990. Internal eliminated sequences are removed prior to chromosome fragmentation during development in *Euplotes crassus*. *Nucl. Acids Res.* 18 : 845—853.
- Walker G. K., Goode D. 1976. The role of microtubules in micronuclear division in the hypotrich ciliates *Gastrostyla steinii* and *Stylonychia mytilus*. *Cytobiologie.* 14 : 18—37.
- Wang W., Zhi H., Chai B., Liang A. 2005. Cloning and sequence analysis of the micronuclear and macronuclear gene encoding Rab protein of *Euplotes octocarinatus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69 : 649—652.
- Wefes I., Lipps H. J. 1990. The two macronuclear histone H4 genes of the hypotrichous ciliate *Stylonychia lemnae*. *DNA Seq.* 1 : 25—32.
- Wegner M., Helftenbein E., Muller F., Meinecke M., Muller S., Grummt F. 1989. Identification of an amplification promoting DNA sequence from the hypotrichous ciliate *Stylonychia lemnae*. *Nucl. Acids Res.* 17 : 8783—8802.
- Weiden M., Osheim Y. N., Beyer A. L., Van der Ploeg L. H. T. 1991. Chromosome structure: DNA nucleotide sequence elements of a subset of the minichromosomes of the protozoan *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell. Biol.* 11 : 3823—3834.
- Williams K. R., Herrick G. 1991. Expression of the gene encoded by a family of macronuclear chromosomes generated by alternative DNA processing in *Oxytricha fallax*. *Nucl. Acids Res.* 19 : 4717—4724.
- Wobbe C. R., Struhl K. 1990. Yeast and human TATA-binding proteins have nearly identical DNA sequence requirements for transcription *in vitro*. *Mol. Cell. Biol.* 10 : 3859—3867.
- Wunning I. U., Lipps H. J. 1983. A transformation system for the hypotrichous ciliate *Stylonychia mytilus*. *EMBO J.* 2 : 1753—1757.
- Yao M. C., Fuller P., Xi X. 2003. Programmed DNA deletion as an RNA-guided system of genome defense. *Science.* 300 : 1581—1594.
- Zahler A. M., Prescott D. M. 1988. Telomere terminal transferase activity in the hypotrichous ciliate *Oxytricha nova* and a model for replication of the ends of linear DNA molecules. *Nucl. Acids Res.* 16 : 6953—6972.
- Zahler A. M., Prescott D. M. 1989. DNA primase and the replication of the telomeres in *Oxytricha nova*. *Nucl. Acids Res.* 17 : 6299—6317.
- Zassoukhina I. B., Kostygov A., Skovorodkin I. N., Ammermann D., Guenzl A. 2002. Identification of the sequences regulating

transcription in alpha tubulin genes of the hypotrichous ciliate *Stylonychia lemnae*. In: 21 Jahrestagung der deutschen Gesellschaft fuer Protozoologie. Konstanz. 64.

Zenzie-Gregory B., Khachi A., Garraway I. P., Smale S. T. 1993. Mechanism of initiator-mediated transcription: evidence for a

functional interaction between the TATA-binding protein and DNA in the absence of a specific recognition sequence. Mol. Cell. Biol. 13 : 3841—3849.

Поступила 4 IV 2006

STYLYNYCHIA LEMNAE AS A MODEL ORGANISM FOR STUDIES OF MACRONUCLEAR
MINICHROMOSOMES OF THE CILIATES

A. Yu. Pimenov, I. B. Raikel, I. N. Skovorodkin, Yu. I. Podlipaeva, D. Ammermann, S. O. Skarlato¹

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

¹ e-mail: sergei_skarlato@yahoo.com

The unique structural and functional organization of macronuclear (somatic nucleus) genome of the spirotrichous ciliates, exemplified by *Stylonychia lemnae*, has been reviewed. Data on the architecture of *S. lemnae* nuclear apparatus at interphase and during vegetative cell division, conjugation or autogamy are summarized. Special attention being paid to the structural and functional peculiarities of short macronuclear minichromosomes known to contain protein-coding regions, 5'- and 3'-flanking nontranslated regions, and telomeres. A hypothesis, previously put forward, according to which in the spirotrichous ciliates the telomeres themselves may serve as starting points of replication in minichromosomes, has now received its further substantiation. The recent experimental data, which confirm that 5'-nontranscribed DNA leader sequence of $\alpha 1$ - and $\alpha 2$ -tubulin-encoding minichromosomes display at least several regulatory elements typical for eukaryote promoter (TA-TA-box, CAAT-box, transcriptional initiator), are discussed. Up to now, there is no confirmation with regard to a possible existence in the spirotrichous minichromosomes of specific regulatory sequences capable of controlling both replication and transcription processes.

Key words: ciliates, macronucleus, minichromosomes of lower eukaryotes, nuclear apparatus.