

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ОПИСАНИЕ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИХ КАРИОТИПОВ МАКРОНУКЛЕУСА ВИДОВ-ДВОЙНИКОВ *PARAMECIUM PRIMAURELIA* И *PARAMECIUM NOVAURELIA*

© И. В. Некрасова,¹ А. А. Потехин,^{1,*} Е. Пржибош,² М. С. Раутиан¹

¹ Биолого-почвенный факультет С.-Петербургского государственного университета
и ² Институт систематики и эволюции животных АН Польши, Краков;

* электронный адрес: aurelia@fromru.com

Геном макронуклеуса (МАК) инфузорий, состоящий из множества в разной степени амплифицированных фрагментов ДНК, не может быть исследован традиционными методами цитогенетики. Методом пульс-электрофореза (ПЭФ) изучена молекулярная организация генома МАК двух видов-двойников комплекса *Paramecium aurelia* — *P. primaurelia* и *P. novaurelia*. ПЭФ-профиль каждого клона стабильно воспроизводится в разных экспериментах и не меняется при старении МАК. В ПЭФ-профилях всех проанализированных клонов обоих видов всегда можно выявить несколько блоков — ярких полос и зон на фоне сплошного спектра молекул ДНК; некоторые такие зоны могут быть в свою очередь разделены на блоки второго порядка. Блоки ПЭФ-профилей могут быть использованы как «внутренние маркеры», что облегчает проведение сравнительного анализа. При сравнении электрофоретических кариотипов *P. primaurelia* и *P. novaurelia* обнаружены заметные межвидовые различия при невысоком уровне внутривидового полиморфизма. Примечательно, что различия внутри *P. novaurelia* были отмечены только при сравнении клона, выделенного в США, с европейскими клонами этого вида. Выявленные упорядоченность и стабильность организации генома МАК в перспективе позволят с новых позиций подойти к анализу механизмов формирования и поддержания этого нетривиального генома. Дальнейшее сравнение геномов МАК разных видов парамеций и сопоставление данных такого анализа с филогенией рода могут пролить свет на направление эволюции формирования и организации генома МАК у инфузорий.

Ключевые слова: комплекс видов *Paramecium aurelia*, виды-двойники, геном макронуклеуса, кариотип, пульс-электрофорез.

Принятые сокращения: д. — дорожка в геле, МАК — макронуклеус, МИК — микронуклеус, ПЦР — полимеразная цепная реакция, ПЭФ — пульс-электрофорез.

Наличие двух по-разному организованных геномов в одной клетке делает инфузорий уникальной кариологической моделью. Микронуклеус (МИК) содержит десятки мелких хромосом. В целом это транскрипционно инертное ядро, чья основная функция — передача генетической информации дочерним клеткам при половом процессе. Геном макронуклеуса (МАК) активно транскрибируется, определяя фенотип клетки. В ходе полового процесса (конъюгации) МАК постепенно деградирует, а МИК претерпевает мейоз. Новый ядерный аппарат формируется в серии делений зиготического ядра (синкариона), образуемого при слиянии продуктов мейотического деления МИК партнеров. При формировании МАК зиготический геном претерпевает ряд существенных перестроек (см.: Jahn, Klobutcher, 2002): происходит фрагментация исходных хромосом, значительная часть генетического материала элиминируется, а оставшиеся последовательности амплифицируются в разной степени. Общая схема данного процесса одинакова для всех инфузорий, но детали формирования (и соответственно организация) генома МАК сильно различаются у разных групп Ciliophora (Prescott, 1994; Katz, 2001).

Пульс-электрофорез (ПЭФ) — разделение молекул ДНК в геле в меняющемся по направлению электрическом поле — на данный момент является единственным методом, позволяющим анализировать весь геном МАК в целом. ПЭФ дает возможность разделять молекулы ДНК размером от нескольких тысяч до 12 млн нуклеотидных пар (Maule, 1996) — в этот интервал как раз попадают фрагменты ДНК МАК *Paramecium* и *Tetrahymena* (Altschuler, Yao, 1985; Rautian, Potekhin, 2002); ПЭФ применяли для исследования геномов МАК как этих, так и некоторых других инфузорий (Lahlafi, Metenier, 1991; Maercker et al., 1999), но детального анализа и описания ПЭФ-профилей инфузорий никогда не проводили.

Впервые ПЭФ был применен для разделения хромосом дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Каждая хромосома *S. cerevisiae* мигрировала в геле как отдельная полоса (за исключением двух полос, каждая из которых включала в себя по две близкие по размеру хромосомы), что позволило предложить новый термин «электрокариотип» (Carle, Olson, 1985). Поскольку из-за маленького размера и большого числа хромосом для многих протистов оказывается трудным или невозможным получение метафаз-

ных пластинок (Райков, 1978), полосы ПЭФ-профилей можно использовать как своеобразный эквивалент традиционного, классического кариотипа.

Поскольку МАК парамеций содержит несколько сотен амплифицированных фрагментов ДНК, достаточно близких по размеру, их ПЭФ-профиль выглядит как сплошной спектр молекул (Caron, Meyer, 1989; Phan et al., 1989; Потехин и др., 1999). Для некоторых видов парамеций на сплошном фоне молекул ДНК выделяются более или менее четкие полосы (Rautian, Potekhin, 2002). Очевидно, что ПЭФ-профиль МАК отражает частоту и распределение сайтов фрагментации на хромосомах МИК и разную степень амплификации фрагментов ДНК. Нам ранее было показано, что ПЭФ-профиль МАК является стабильной характеристикой любого клона *Paramecium* (Потехин и др., 1999; Некрасова и др., 2004). При сравнительном анализе молекулярной организации генома МАК разных морфологических видов рода *Paramecium* было показано, что ПЭФ-профили разных клонов одного вида, даже изолированных в географически удаленных друг от друга регионах, очень похожи, хотя иногда регистрируются незначительные внутривидовые различия. ПЭФ-профили же представителей разных морфологических видов различаются очень значительно (Rautian, Potekhin, 2002). Таким образом, у парамеций ПЭФ-профиль является видовой характеристикой — соответственно каждый морфологический вид характеризуется собственным определенным паттерном расположения сайтов фрагментации на хромосомах МИК.

Помимо морфологических видов для инфузорий вообще и представителей рода *Paramecium* в частности характерно наличие внутри морфологических видов так называемых видов-двойников, или генетических видов. Виды-двойники практически неотличимы на уровне основных морфологических характеристик, но репродуктивно изолированы друг от друга. Сходство ПЭФ-профилей разных клонов внутри морфологического вида при выраженном отличии электрокариотипов разных морфологических видов друг от друга неминуемо вызывает вопрос о том, насколько различаются ПЭФ-профили генетических видов, таких как представители комплекса видов-двойников *P. aurelia*. Геном МАК одного из этих видов — *P. tetraurelia* — был недавно полностью секвенирован (Argy et al., 2006). Для ПЭФ-профилей МАК представителей комплекса *P. aurelia* характерно наличие ярких полос на фоне сплошного спектра молекул ДНК (Rautian, Potekhin, 2002). Это делает их удобной моделью для сравнительного исследования организации генома МАК — полосы ПЭФ-профилей могут быть использованы как «внутренние маркеры». В данной работе мы представляем детальное описание ПЭФ-профилей МАК и обсуждаем уровни внутри- и межвидового полиморфизма по организации генома МАК для двух видов-двойников комплекса *P. aurelia* — *P. primaurelia* и *P. novaurelia*. Эти виды являются наиболее распространенными представителями комплекса *P. aurelia* в Европе (Przyboś, 2005).

Материал и методика

Использованные культуры. Для выполнения работы использовали 14 клонов *P. primaurelia* и *P. novaurelia*.

P. primaurelia: 156 (Нью-Хейвен, США); 60 (Берлингтон, Вермонт, США); AZ9-3, AZ11-13, AZ12-19 и AZ15-8

(Астраханский заповедник, Россия); B7-6 (Волгоградская обл., Россия); KK2-7 (Калининградская обл., Россия). Клоны из США предоставлены проф. Х. Шмидтом (Университет Кайзерслаутерна, Германия).

P. novaurelia: 91 TP-9 (Санкт-Петербург, Россия); 90 ВЛ-8 (Владимир, Россия); Из-16 (Измаил, Украина); Nov (Германия, предоставлен проф. Х.-Д. Герцем, Университет Штутгарта, Германия); B9-1 (Волгоградская обл., Россия); AB8-22 (Бостон, США).

Все эти клоны поддерживаются в Коллекции клонов *Paramecium* Лаборатории кариологии одноклеточных Биолого-почвенного факультета СПбГУ. Видовую принадлежность использованных клонов определяли методом скрещивания с клонами-тестерами (клон 90 *P. primaurelia*, клон 510 *P. novaurelia*). Культивирование клонов *Paramecium* проводили по стандартной методике (Sonneborn, 1970). Питательной средой служил салатный отвар, инокулированный бактериями *Klebsiella cloacae*.

Синхронизация культур парамеций. Синхронные культуры парамеций получали описанным в литературе методом (Sonneborn, 1970). С помощью микроскопа в отдельные микроаквариумы изолировали клетки, завершающие автогамию (имеющие два развивающихся МАК). Вегетативное потомство каждой такой клетки ежедневно кормили из расчета 800 мкл пищевой средой на 1 клетку (т. е. культуру вели при избыточном кормлении). В таких условиях *P. aurelia* делятся с постоянной высокой скоростью (2—3 деления в 1 сут), и автогамия наступает у клеток одновременно, через 23—27 делений (клетки культуры, ведущейся в стандартных условиях, без избытка среды, начинают разрозненно вступать в автогамию через 18—20 делений). 1 клетку культуры ежедневно изолировали и переводили в новый микроаквариум, что позволяло достаточно точно регистрировать частоту делений всех клеток культуры. Каждые 2 сут несколько сотен клеток стандартно окрашивали по Фельгену (Pearse, 1960), что позволяло точно определить, вступила ли культура в половой процесс, и выявить степень ее синхронности.

Для приготовления препаратов для ПЭФ использовали 10—20 мл культур парамеций, число клеток в которых достигало 10^3 — 10^4 на 1 мл. Мягким центрифугированием клетки концентрировали в объеме 0.3—0.6 мл. Блок-вставки для ПЭФ (смесь суспензии клеток и агарозы) готовили способом, описанным нами ранее (Потехин и др., 1999). В качестве размерного маркера для ПЭФ использовали хромосомы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* штамма 15В-П4, размер которых был определен в нашей лаборатории ранее (Тимофеева, Раутиан, 1997). Приготовление препаратов ДНК дрожжей проводили по стандартной методике (Carle, Olson, 1985).

Для проведения ПЭФ использовали прибор авторской конструкции (Межевая и др., 1991), который позволяет создавать и чередовать два электрических поля с углом переориентации 120° . ПЭФ проводили в 1%-ном агарозном геле (Sea Kem, FMC, США), приготовленном на $0.5 \times$ буфере TBE. Толщина геля составляла 4 мм. Электрофорез проводили в $0.5 \times$ буфере TBE при 16°C . Напряженность поля составляла 10 В/см. В этих условиях оптимального разделения ДНК МАК *P. aurelia* удавалось добиться при следующем режиме ПЭФ: 30 с — 5 ч, 60 с — 7 ч, 90 с — 10 ч, 120 с — 13 ч, 150 с — 8 ч (в секундах — время действия каждого электрического поля, так называемое время пульса, в часах — продолжительность работы прибора при этом времени пульса).

Гибридизация по Саузерну. Разделенную ПЭФ ДНК переносили на нейлоновые мембраны (Amersham Pharmacia Biotech Nylon Membranes, Великобритания) капиллярным способом по методике производителя мембран и иммобилизовали облучением ультрафиолетом. Зонд для гибридизации получали в полимеразной цепной реакции (ПЦР), добавляя в смесь для ПЦР дигоксигенин-11-dUTP (Roche Diagnostics, Mannheim, Германия). В качестве зонда для гибридизации использовали последовательность из макронуклеарного повтора P126 (Forney, Rodkey, 1992); матрицей для ПЦР служила тотально выделенная стандартным методом экстракции фенолом и хлороформом ДНК *P. primaurelia* и *P. novaurelia*, 20–50 нг на реакцию. В качестве праймеров использовали олигонуклеотидные последовательности 5'-tctatcscgttatgggatgt-3' и 5'-cactaccgggatgctaataatga-3' (Синтол, Россия), выбранные из последовательности повтора P126 *P. tetraurelia* (GenBank M96642). Параметры ПЦР для синтеза зонда (термоциклер Techne, Великобритания): 94 °С — 45 с, 55 °С — 45 с, 72 °С — 45 с — 30 циклов, с увеличенным до 4 мин временем плавления в первом цикле и увеличенным до 3 мин временем отжига в первых трех циклах. Выход ПЦР контролировали с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле в 0.5× буфере TBE.

Гибридизацию по Саузерну проводили по стандартной методике производителя мембран при 61 °С. Детекцию сигнала проводили, используя набор для колориметрического выявления дигоксигенина (Roche Diagnostics, Mannheim, Германия) и следуя рекомендациям произво-

дителя. Термические отмывки мембран после гибридизации проводили в 0.5× SSC при температуре на 1 °С выше температуры гибридизации.

Результаты

Описание ПЭФ-профилей *P. primaurelia* и *P. novaurelia*. Мы проанализировали методом ПЭФ 14 клонов двух видов комплекса *P. aurelia* — *P. primaurelia* и *P. novaurelia*. Размер молекул ДНК МАК этих инфузорий варьирует примерно от 75 до 1100 т. п. н. Кроме того, иногда удается выявить наличие высокомолекулярных фрагментов ДНК (около 2500 т. п. н.), образующих дополнительную отдельную слабо выраженную полосу (например, на рис. 1 показана стрелкой). Для ПЭФ-профилей всех проанализированных клонов, как и для других представителей комплекса *P. aurelia* (Некрасова и др., 2004), характерно наличие полос на фоне сплошного спектра молекул ДНК (рис. 1). Эти полосы могут использоваться как надежные «внутренние маркеры» ПЭФ-профилей *P. aurelia*. Такая исчерченность ПЭФ-профилей *P. aurelia* натолкнула нас на идею использовать при их описании иерархическую номенклатуру блоков по аналогии с системой, применяемой при описании G-исчерченности метафазных хромосом млекопитающих (Summer, 1990). Сначала были отмечены наиболее ярко выраженные блоки (размерные фракции) исследуемого ПЭФ-профиля — те, которые четко выявляются при любых параметрах проведения эксперимента. Для ПЭФ-профилей

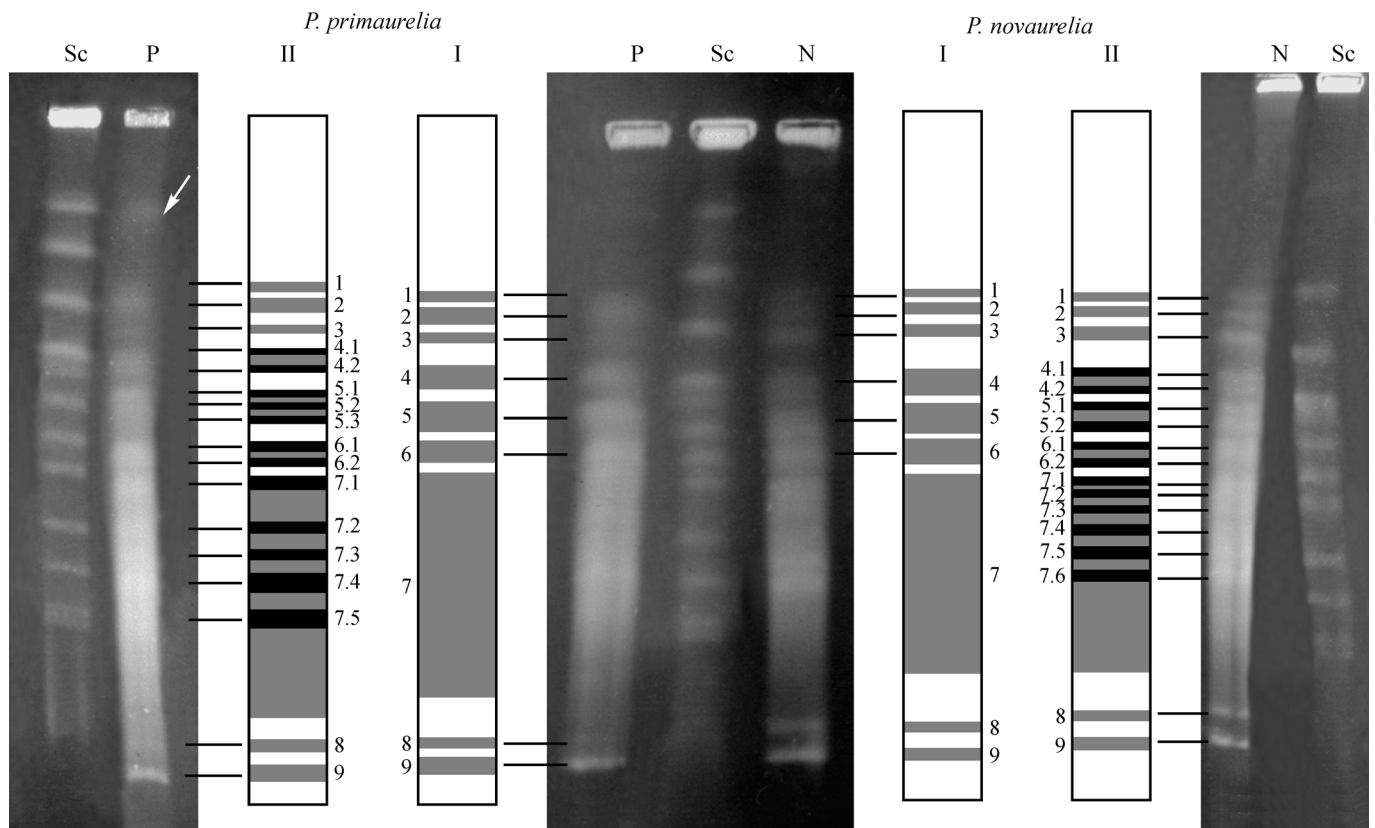


Рис. 1. ПЭФ-профили *Paramecium primaurelia* (P) и *P. novaurelia* (N) и их изображение в виде схем блоков первого (I) и второго (II) порядков.

Sc — хромосомы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Стрелкой показана высокомолекулярная полоса (около 2500 т. п. н.).

Приблизительный размер молекул ДНК, формирующих блоки первого и второго порядков в электрокарриотипах *Paramecium novaurelia* и *P. primaurelia*

<i>P. novaurelia</i>			<i>P. primaurelia</i>		
блоки электрокарриотипа		приблизительный размер молекул ДНК, т.п.н.	блоки электрокарриотипа		приблизительный размер молекул ДНК, т.п.н.
1-го порядка	2-го порядка		1-го порядка	2-го порядка	
1	—	1060—1100	1	—	1010—1030
2	—	1000—1020	2	—	950—980
3	—	900—930	3	—	890—930
4	4.1	820	4	4.1	820—840
	4.2	780—800		4.2	770—800
5			5	5.1	700—740
	5.1	690—700		5.2	660—690
	5.2	640—650		5.3	630—650
6	6.1	590—630	6	6.1	590—630
	6.2	570—590		6.2	570—590
7	7.1	520	7	7.1	510—550
	7.2	500			
	7.3	470		7.2	470
	7.4	430		7.3	410
	7.5	380			
	7.6	330		7.4	340
				7.5	250
8	—	105	8	—	90
9	—	75	9	—	65

Примечание. Блоки расположены в таблице в соответствии с размером формирующих их молекул ДНК, так что можно легко сравнить характеристики двух видов.

всех исследованных клонов можно выделить девять таких блоков — эти блоки мы назвали «блоками первого порядка». Некоторые блоки состоят из двух или более полос, которые могут сливаться или, наоборот, разделяться при разных режимах проведения ПЭФ. Такие полосы мы назвали «блоками второго порядка». Поскольку, как уже было сказано выше, ПЭФ-профили *Paramecium* представляют собой спектр фрагментов ДНК разного размера, описание электрокарриотипов только на основании размерных характеристик может приводить к большому количеству неточностей, особенно при сравнении результатов, полученных разными авторами в разных экспериментах. Предложенное нами «формализованное» описание электрокарриотипов облегчает сравнительный анализ и сопоставление получаемых данных. Мы разработали детальное иерархическое описание электрокарриотипов для двух видов комплекса *P. aurelia* — *P. primaurelia* и *P. novaurelia*.

P. primaurelia. Было исследовано восемь клонов *P. primaurelia*. ПЭФ-профили всех проанализированных клонов представляют собой сплошной спектр молекул ДНК разного размера, в составе которого можно четко выделить девять полос и зон — блоков первого порядка (см. таблицу; рис. 1). Три верхних блока (блоки 1, 2 и 3) никогда не разделяются на блоки второго порядка; блок 2 всегда более яркий, чем блоки 1 и 3. Блоки 4 и 6 можно разделить на два блока второго порядка каждый. Блок 5

на ПЭФ-профилях некоторых клонов (например, клон 156) разделен на два блока второго порядка (рис. 2, д. 5), в то время как на ПЭФ-профилях других клонов (AZ15-8 и AZ11-13) внутри блока 5 можно выявить три блока второго порядка (рис. 2, д. 1, 2). Внутри блока 7 — протяженной зоны ПЭФ-профиля, которую образуют молекулы ДНК размером примерно от 500 до 100 т. п. н., — всегда можно выделить пять блоков второго порядка. У всех исследованных клонов также хорошо выражены два четких нижних блока, 8 и 9, не разделяемых на блоки второго порядка. В целом ПЭФ-профили всех клонов *P. primaurelia* очень похожи, хотя существуют и некоторые внутривидовые различия. Так, у клон 60 блоки 5 и 6 четко разделены на два блока второго порядка каждый, причем они настолько явно выражены, что могут рассматриваться даже как блоки первого порядка (рис. 2, д. 4, отмечены *стрелками*). Это отличает клон 60 от остальных проанализированных клонов *P. primaurelia*.

P. novaurelia. Было исследовано шесть клонов *P. novaurelia*. ПЭФ-профиль *P. novaurelia* является наиболее «четким» по сравнению с ПЭФ-профилями остальных видов *P. aurelia* (Некрасова и др., 2004). Он также содержит девять блоков первого порядка (см. таблицу; рис. 1). Три верхние полосы — блоки 1, 2 и 3 — очень яркие, не разделяются на блоки второго порядка; наиболее ярким обычно является блок 3. Затем идут три менее компактных блока (4, 5 и 6), каждый из которых может быть разделен на два блока второго порядка. Внутри блока 7 может быть выделено не менее пяти блоков второго порядка. Затем следуют две четкие полосы, обозначаемые нами как блоки 8 и 9. Такой рисунок ПЭФ-профиля характерен для всех пяти проанализированных европейских клонов (рис. 2, д. 7—10). Однако ПЭФ-профиль единственного существующего клон *P. novaurelia* американского происхождения AB8-22 (Przyboś et al., 2007) отличался от остальных (рис. 3). Так, блок 5 в ПЭФ-профиле этого клон разделен на три четких блока второго порядка, в то время как для всех европейских клонов *P. novaurelia* характерно наличие двух блоков второго порядка внутри блока 5. Кроме того, из первых трех блоков у всех европейских клонов самым ярким является блок 3, а в случае клон AB8-22 самым ярким оказывается блок 2. Отметим, что в случае *P. primaurelia* выявленные различия ПЭФ-профилей не коррелировали с географическим происхождением клонов.

Несмотря на обнаруженные нами внутривидовые различия, можно утверждать, что для обоих исследованных видов комплекса *P. aurelia* ПЭФ-профили всех клонов внутри вида очень похожи друг на друга и существенно отличаются от ПЭФ-профилей представителей другого вида (рис. 2). Т. е. по рисунку ПЭФ-профиля мы можем однозначно отличить представителей *P. primaurelia* от представителей *P. novaurelia*: у всех *P. novaurelia* (кроме клон AB8-22) из блоков 1, 2 и 3 самым ярким является блок 3, а у всех без исключения представителей *P. primaurelia* самый яркий — блок 2; блоки 4, 5 и 6 у *P. novaurelia* очень четкие и отдельные, в то время как у представителей *P. primaurelia* они более «смазаны».

Влияние старения МАК на ПЭФ-профили. Автогамия — половой процесс, проходящий внутри одной клетки, в отсутствие партнера, — является характерной чертой всех видов *Paramecium aurelia* (Wichtermann, 1986). В норме клетки клон проходят автогамно приблизительно через каждые 25—30 делений. Если культура не синхронизирована, в каждый момент времени все клетки

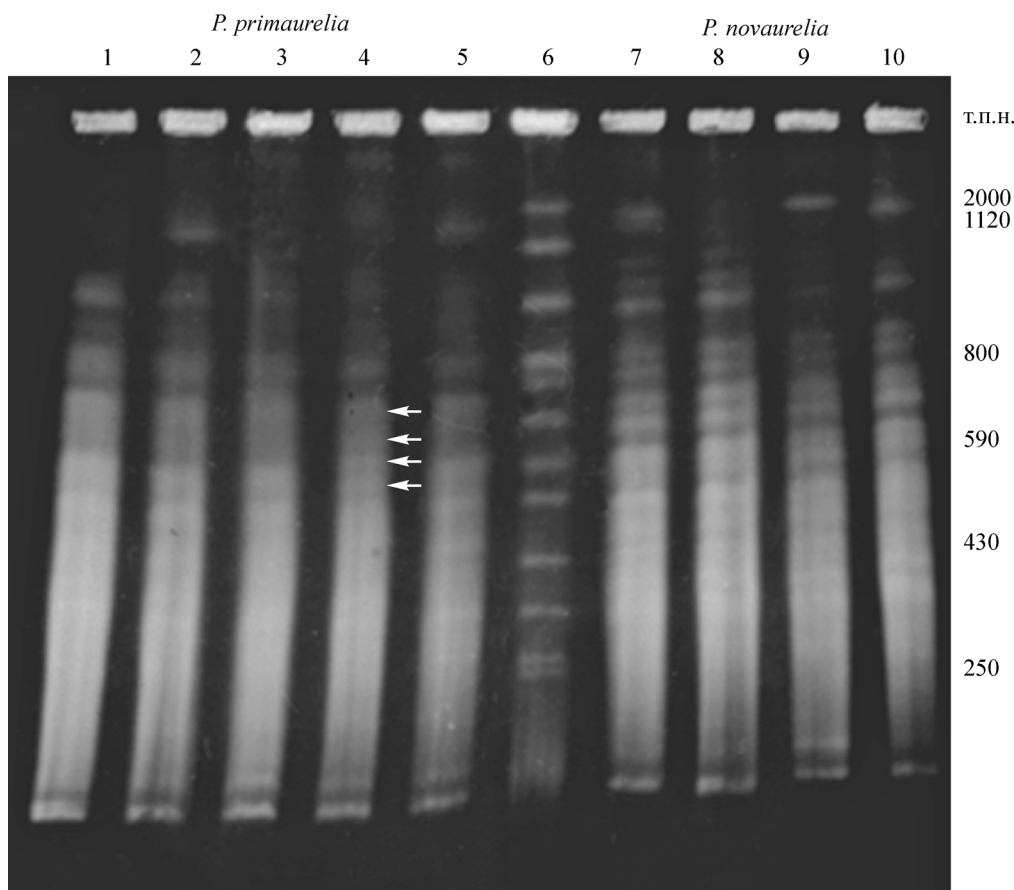


Рис. 2. ПЭФ-профили пяти клонов *Paramecium primaurelia* (д. 1—5) и четырех клонов *P. novaurelia* (д. 7—10).

Дорожки: 1 — AZ15-8, 2 — AZ11-13, 3 — В7-6, 4 — 60, 5 — 156, 6 — хромосомы *Saccharomyces cerevisiae*, 7 — 91ГР-9, Из-16, 9 — В9-1, 10 — ВЛ4-8. Стрелками показаны полосы ПЭФ-профиля, отличающие клон 60 от остальных клонов *P. primaurelia*.

клона различаются по числу делений, пройденных ими после последней автогамии. Во время каждой автогамии старый МАК разрушается. У автогамонтов МАК формируется заново из продуктов митотического деления синкариона. Соответственно разные клетки клона различаются по «возрасту» своих МАК. Поскольку МАК делится амитозом и в дочерних клетках остается разное количество ДНК (Berger, 2001), по мере старения МАК теоретически могут возникать изменения в молекулярной композиции его генома. Т. е. каждый клон *P. aurelia* — клеточная линия, полученная из одной изолированной клетки, — является клоном относительно генома МИК, но популяцией относительно генома МАК. Это может приводить к тому, что в случае использования в экспериментах несинхронизированных культур разные клетки клона будут различаться по молекулярной композиции генома МАК. Таким образом, необходимо было проверить, не вызывает ли старение МАК детектируемых изменений в ПЭФ-профилях, способных исказить результаты.

Мы синхронизировали клон AZ9-3 *P. primaurelia* и сравнили ПЭФ-профили культур, состоящих из клеток с молодыми МАК (сразу после автогамии), зрелыми МАК (в середине жизненного цикла, 10—20 делений после автогамии), старыми МАК (27 делений, непосредственно перед автогамией), и собственно клеток, проходящих автогамию. Было показано, что ПЭФ-профили клеток, прошедших 10, 15, 20 и 27 делений после автогамии, никак не различаются (рис. 4). Единственное различие заключа-

лось в том, что в ПЭФ-профилях ранних поставогадных клеток и клеток, прошедших не больше 15 делений после автогамии, обнаруживалась высокомолекулярная полоса (рис. 4, отмечена стрелкой справа), которая по мере прохождения клетками дальнейших делений становилась все менее выраженной. На некоторых препаратах несинхронизированных клонов, использованных нами, аналогичная полоса также была заметна.

Анализ ПЭФ-профилей с помощью гибридизации по Саузерну. В качестве дополнительного критерия в сравнительном анализе ПЭФ-профилей клонов *P. primaurelia* и *P. novaurelia* мы проводили гибридизацию по Саузерну разделенной методом ПЭФ ДНК разных клонов двух исследуемых видов с последовательностью повтора P126. Этот повтор был обнаружен в прителомерных районах большинства молекул ДНК МАК *P. tetraurelia* (Forney, Rodkey, 1992). Таким образом, использование повтора P126 позволяет получать паттерн гибридизации со множеством сигналов, который может рассматриваться как еще одна дополнительная характеристика полиморфизма геномов. Мы получили сложный паттерн гибридизации для обоих исследуемых видов: как минимум 12 отдельных сигналов в случае *P. novaurelia* и 10 сигналов в случае *P. primaurelia* (рис. 5); для обоих видов наблюдали также фоновую гибридизацию. В целом во всех случаях полученный паттерн гибридизации сильно напоминает рисунок собственно ПЭФ-профиля, что подтверждает исходные данные о локализации повтора

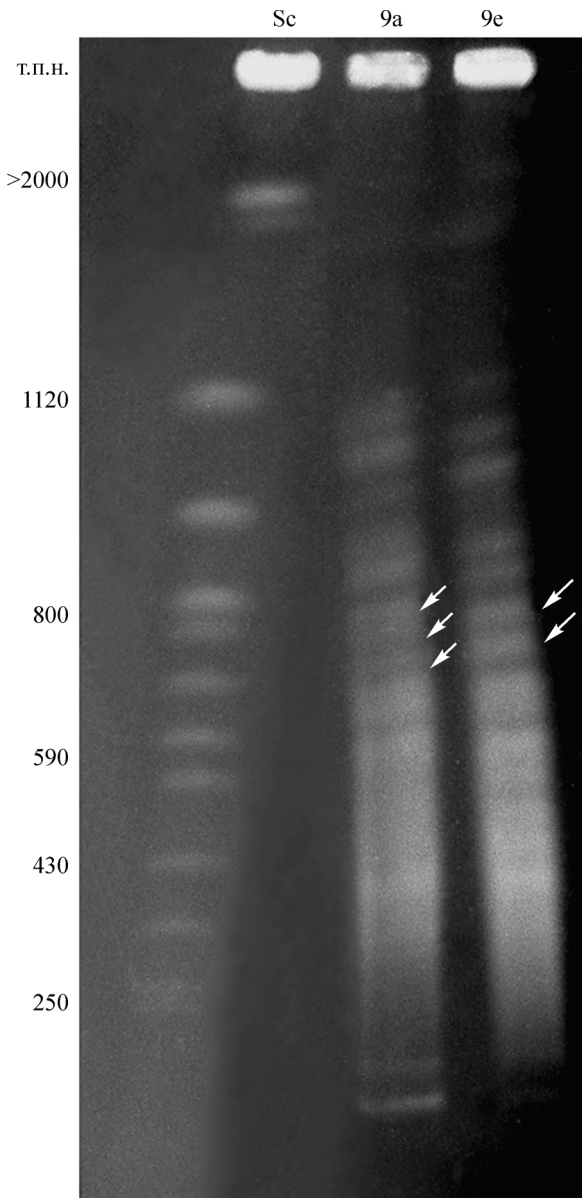


Рис. 3. ПЭФ-профили американского (АВ8-22; δ. 9а) и одного из европейских (Из-16; δ. 9е) клонов *Paramecium novaurelia*. Стрелками показаны различающиеся у клонов блоки. Sc — хромосомы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

P126 на многих различных фрагментах ДНК МАК (Fogney, Rodkey, 1992). Тем не менее не все фрагменты ДНК МАК содержат повтор P126: например, молекулы ДНК, формирующие яркие блоки 1 и 6.2 в ПЭФ-профилях *P. novaurelia*, не дают сигнала при гибридизации с последовательностью P126 (рис. 5, отмечено стрелками). Полученный паттерн гибридизации, как и сам электрокариотип МАК, является видоспецифичным. Внутривидовых различий между разными клонами практически не было обнаружено, но все представители *P. primaurelia* по своему паттерну гибридизации явно отличаются от представителей *P. novaurelia*.

Обсуждение

Поскольку количество ДНК МИК у *P. aurelia* составляет менее 1 % от общего количества ДНК в клетке (Райков, 1978), практически вся ДНК, разделяемая с помощью ПЭФ, — это ДНК МАК, причем большая часть ПЭФ-профиля, собственно описываемый нами спектр, сформирована исключительно ДНК МАК. Геном МАК другого вида *Paramecium*, родственного *P. aurelia*, — *P. caudatum* — включает в себя около 300 фрагментов ДНК разного размера (Потехин и др., 1999), амплифицированных в разной степени. В результате оказывается невозможным осуществить разделение в ПЭФ отдельных молекул ДНК МАК в виде дискретных полос. Действительно, ПЭФ-профиль всех представителей *P. aurelia* представляет собой сплошной спектр молекул, на фоне которого, тем не менее, выделяются отдельные зоны и полосы. Аналогичную картину наблюдали и авторы первых работ по разделению ДНК *Paramecium aurelia* методом ПЭФ (Caron, Meyer, 1989; Phan et al., 1989), однако нам удалось получить ПЭФ-профили с лучшим разрешением. Некоторые блоки удается выявить лишь при определенных режимах проведения ПЭФ, что затрудняет прямое описание и сравнение ПЭФ-профилей, полученных в разных экспериментах. Предложенный нами принцип иерархического описания ПЭФ-профилей помогает решить эту проблему — паттерн расположения блоков первого порядка в ПЭФ-профиле является постоянной, не зависящей от частных особенностей проведения эксперимента характеристикой клона и даже, вероятно, генетического вида внутри комплекса *P. aurelia*. Единственная полоса, которую не всегда удается выявить на ПЭФ-профилях, — это полоса, образованная высокомолекулярной ДНК (>2000 т. п. н.). Наши эксперименты по исследованию влияния старения МАК клеток на рисунок ПЭФ-профилей, проведенные на синхронизированных культурах, показали, что данная полоса очень ярко выражена на ПЭФ-профилях поставогамных клеток, а затем по мере прохождения клетками клона дальнейших делений постепенно сходит на нет. Весьма вероятно, что автогамия даже в синхронизированной культуре растягивается во времени, и высокомолекулярная полоса формируется за счет той части клеток, в которой именно в этот момент происходит процессинг ДНК. Постепенно доля таких клеток в синхронизированной культуре уменьшается, и полоса становится все менее и менее выраженной. Другим вероятным объяснением появления этой высокомолекулярной полосы в ПЭФ-профилях является продолжительное присутствие недопроцессированной ДНК в созревающем МАК. Возможно, процессинг ДНК еще продолжается в клетках, которые после прохождения полового процесса уже перешли к вегетативным делениям, хотя это противоречит общепринятому мнению о том, что формирование генома полностью заканчивается к тому моменту, когда МАК приобретает способность к делению (Prescott, 1994). По мере деления клеток количество таких молекул в каждой клетке будет уменьшаться и постепенно станет слишком незначительным, чтобы выявляться методом ПЭФ. Кроме того, данная полоса может содержать хромосомы МИК, размер которых слишком велик для разделения методом ПЭФ. Однако, как было замечено выше, относительное содержание ДНК в МИК очень мало — возможно, даже слишком, для того стабильно выявляться в ПЭФ-профилях. Нельзя также полностью отбрасывать и возможность того, что в состав высокомолекулярной по-

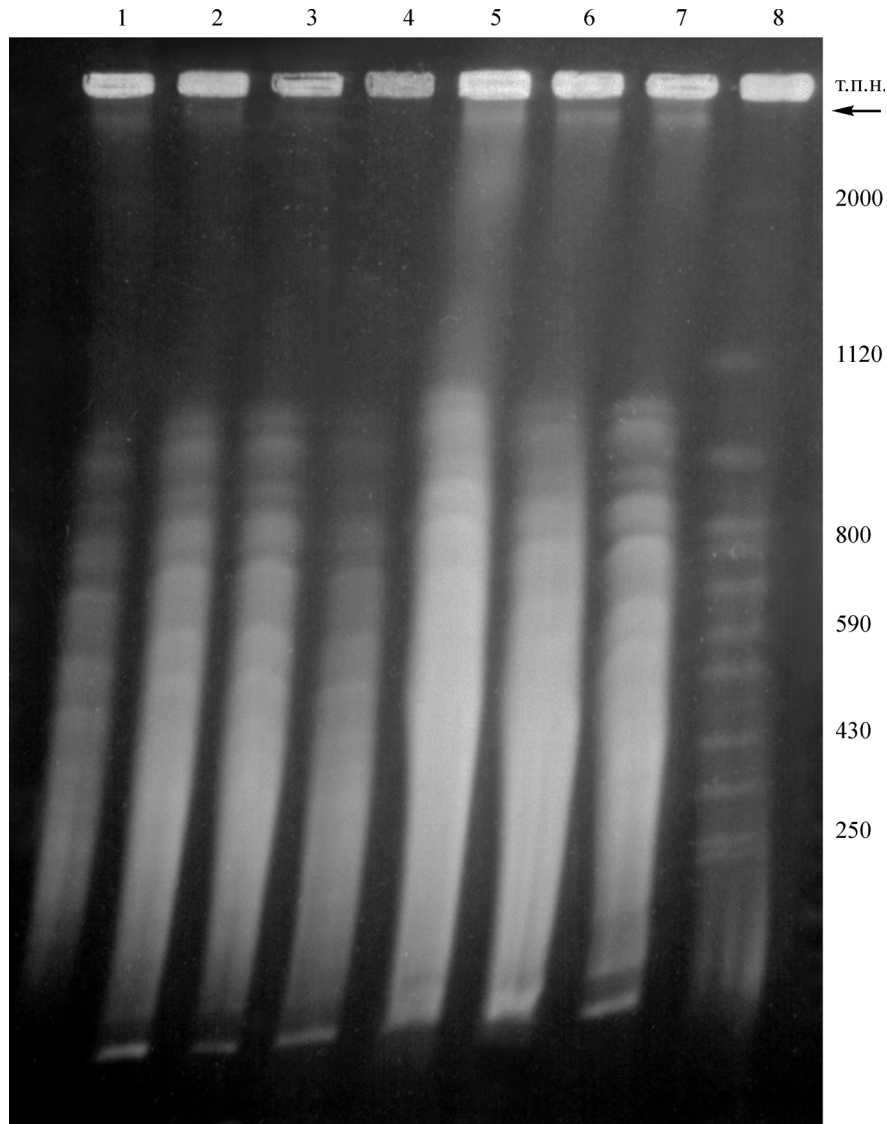


Рис. 4. ПЭФ-профили синхронизированного клона AZ9-3 *Paramecium primaurelia* на разных этапах старения МАК.

Д. 1 — 15 делений после автогамии, д. 2 — 20 делений, д. 3 — 27 делений, д. 4 — 70 % клеток вступили в автогамию (в клетках несколько продуктов деления МИК), д. 5 — в автогамонтах начинается формирование новых МАК, д. 6 — в поставтогамных клетках крупные зачатки новых МАК и мелкие фрагменты старых МАК, д. 7 — 10 делений после автогамии, д. 8 — хромосомы *Saccharomyces cerevisiae*. Стрелкой справа показана высокомолекулярная ДНК в ПЭФ-профилях.

лосы может входить в том числе и ДНК пищевых бактерий, несмотря на то что препараты ДНК готовили из отмытых от пищевой среды парameций, пищеварительные вакуоли которых были практически пусты. Так или иначе, данную высокомолекулярную полосу нельзя рассматривать как постоянную характеристику электрокаротипов *P. aurelia*, поэтому мы не включаем ее в число блоков, выделяемых при иерархическом описании ПЭФ-профилей.

Важно еще раз отметить, что, за исключением данной высокомолекулярной полосы, нами не было выявлено никаких изменений рисунка ПЭФ-профилей, связанных со старением МАК клеток. Уникальный способ деления МАК, amitoz, приводит к тому, что каждое деление сопряжено со случайным изменением числа копий различных молекул ДНК (Berger, 2001). Это теоретически могло бы приводить к глобальным изменениям в молекулярной композиции генома МАК и соответственно в рисунке

ПЭФ-профилей. Тем не менее результаты наших экспериментов с использованием синхронизированных культур однозначно показывают, что подобных изменений не происходит. Ранее (Gilley, Blackburn, 1994) было показано, что при старении синхронизированной культуры *P. tetraurelia*, в которой автогамию искусственно ингибировали, происходила постепенная деградация молекул ДНК: сигнал гибридизации, который в поставтогамных клетках был виден как четкая полоса, после прохождения клетками 50 и более делений после автогамии становился размытым — помимо исходной полосы возникал дополнительный «шлейф». Это означает, что происходит укорочение части молекул ДНК, несущих мишень для гибридизации вследствие их постепенной деградации. Описанные изменения также могли бы сказываться на рисунке ПЭФ-профилей, приводя к появлению дополнительного «фона» деградирующих молекул ДНК разного размера и соответственно снижению четкости полос и

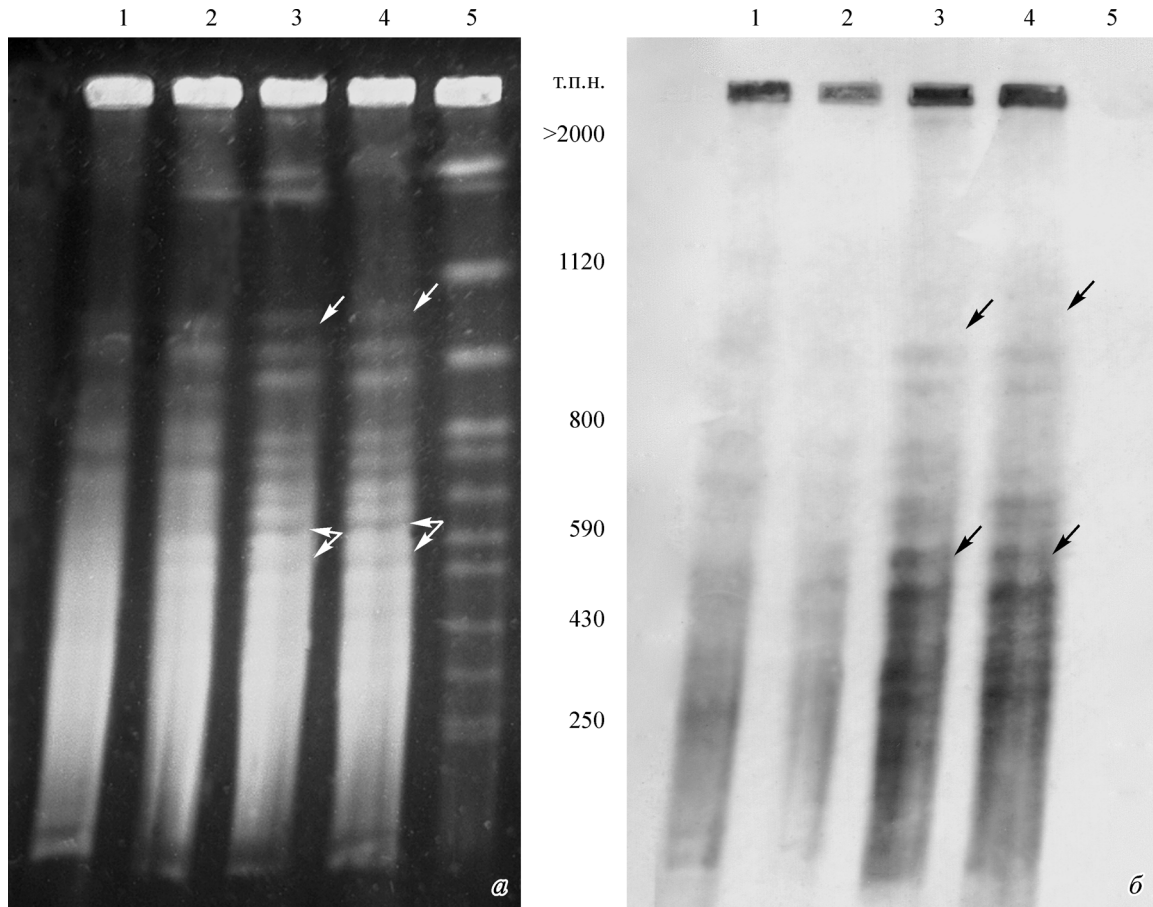


Рис. 5. Результаты разделения ПЭФ (а) и гибридизация по Саузерну с последовательностью P126 (б) тотальной ДНК двух клонов *Paramecium primaurelia* (д. 1 — клон 60, д. 2 — клон AZ11-13) и двух клонов *P. novaurelia* (д. 3 — клон 91ТР-9, д. 4 — клон Из-16).

Д. 5 — хромосомы *Saccharomyces cerevisiae*. Стрелками отмечены блоки, на которых не наблюдается сигнала гибридизации.

блоков. Однако наблюдать этот феномен можно, только целенаправленно лишая инфузорий возможности вступить в автогамию и обновлять геном МАК на протяжении нескольких десятков циклов вегетативных делений. В обычных лабораторных культурах *P. aurelia* в отсутствие агентов, ингибирующих половой процесс, число делений, которое проходит поставогадная клетка до следующей автогамии, не превышает 25—30 даже при условии избытка пищи (Sonneborn, 1970). В этих условиях заметной деградации молекул ДНК МАК еще не происходит (Gilleu, Blackburn, 1994), и рисунок ПЭФ-профилей остается неизменным. Таким образом, для получения объективных данных методом ПЭФ не обязательно использовать синхронизированные культуры, поскольку возможные изменения, происходящие с геномом МАК при старении этого ядра, в обычных условиях не оказывают принципиального влияния на его молекулярную композицию и, следовательно, на рисунок ПЭФ-профиля.

Происхождение полос в ПЭФ-профилях *P. aurelia* может быть связано как с гиперплификацией некоторых фрагментов ДНК в МАК, так и с тем, что разные фрагменты ДНК МАК, близкие по размеру, группируются при разделении в геле. Так, было показано, что верхняя полоса в ПЭФ-профиле *P. tetraurelia* образована единственной многокопийной молекулой ДНК размером 984.6 т. п. н. (Zagulsky et al., 2004). Поскольку блок 1 электрокариотипов *P. primaurelia* и *P. novaurelia* выражен так же ярко и

расположен приблизительно в той же размерной области, можно предположить, что этот блок также образован единственным гиперплифицированным фрагментом ДНК. В 2006 г. было завершено полное секвенирование генома МАК *P. tetraurelia* (Aury et al., 2006; <http://paramecium.cgm.cnrs-gif.fr/db/index>). Весь геном МАК был представлен как набор «скэффолдов», собранных из перекрывающихся секвенированных последовательностей ДНК и на обоих концах заканчивающихся теломерами. Таким образом, каждый «скэффолд» соответствует отдельному фрагменту ДНК МАК. Сопоставляя размеры, указанные для каждого «скэффолда», и приблизительные размеры молекул ДНК, формирующих те или иные полосы электрокариотипов, можно объяснить вероятное происхождение по крайней мере некоторых полос ПЭФ-профилей представителей *P. aurelia*. Так, первые три «скэффолда» генома МАК *P. tetraurelia* имеют размеры 984, 950 и 893 т. п. н. соответственно. Приблизительный размер молекул ДНК, формирующих три первых блока электрокариотипа *P. primaurelia* (см. таблицу), составляет 1020, 960 910 т. п. н. Выявляется соответствие: блок 1 *P. primaurelia* — «скэффолд» 1 *P. tetraurelia*, блок 2 — «скэффолд» 2, блок 3 — «скэффолд» 3. В случае *P. novaurelia* приблизительные размеры молекул ДНК, образующих первые три полосы электрокариотипа (см. таблицу), несколько превышают размеры первых трех «скэффолдов» *P. tetraurelia* (блок 1 — 1080 т. п. н., блок 2 —

1010 т. п. н., блок 3 — 915 т. п. н.), но вероятно, что и в этом случае каждый из этих трех блоков образован единственным типом фрагментов ДНК. Дальнейшее соответствие без дополнительного анализа выявить затруднительно из-за слишком незначительных различий в размерах скэффолдов; при этом возможны различия в организации генома МАК представителей разных видов. Косвенно именно такое происхождение первых трех блоков ПЭФ-профиля *P. primaurelia* и *P. novaurelia* подтверждают и результаты гибридизации с последовательностью P126. На блоке 1 ПЭФ-профиля *P. novaurelia* отсутствует сигнал гибридизации. Так как прителомерный повтор P126 присутствует на большей части молекул ДНК МАК, вероятность того, что в блоке 1 сгруппировано несколько типов молекул ДНК, ни одна из которых не содержит данного повтора, не очень высока. При этом блок 1 электрокаротипа *P. novaurelia* выражен не менее интенсивно, чем блоки 2 и 3, дающие при гибридизации яркий сигнал.

Итак, полученные данные подтверждают ранее высказанное нами утверждение: получаемые ПЭФ-профили отражают нативный спектр молекул ДНК, представленных в геноме МАК парамеций (Потехин и др., 1999; Rautian, Potekhin, 2002), и не зависят от возраста и физиологического состояния культуры. Выявленная упорядоченность и стабильность организации генома МАК — необычного ядра, которое еще недавно из-за отсутствия методик анализа генома называли «мешком с генами» (Prescott, 1994), — в перспективе позволит с новых позиций подойти к анализу механизмов формирования и поддержания этого нетривиального генома.

Даже филогенетически близкие морфологические виды *Paramecium* удивительно сильно различаются по молекулярной организации генома МАК (Rautian, Potekhin, 2002). Эти различия слишком велики для того, чтобы можно было проследить какие-либо тенденции изменений в программе формирования генома МАК в эволюции *Paramecium*. В то же время ПЭФ-профили разных сингенов у некоторых видов (сингены в целом можно рассматривать как ранний этап дивергенции видов) характеризуются высоким сходством (Потехин и др., 1999; Rautian, Potekhin, 2002). Комплекс видов *P. aurelia* является прекрасной моделью для проведения сравнительных исследований, поскольку включает в себя 15 сингенов, окончательно превратившихся в настоящие виды-двойники (Sonneborn, 1975; Aufderheide et al., 1983). В данной работе мы показали, что геномы МАК *P. primaurelia* и *P. novaurelia* формируются по сходному паттерну — наиболее ярко выраженные блоки первого порядка у проанализированных клонов обоих видов совпадают. С другой стороны, были обнаружены некоторые различия не только между представителями видов *P. primaurelia* и *P. novaurelia*, но даже между разными клонами внутри каждого вида. В случае *P. primaurelia* нами не выявлено закономерностей в возникновении внутривидового полиморфизма, в случае *P. novaurelia* внутривидовые различия оказались характерными для клонов, выделенных из географически надежно разобщенных популяций. Тем не менее этих данных недостаточно, для того чтобы судить о причинах возникновения внутривидового полиморфизма по организации генома МАК и о потенциальной роли географической изоляции в этом процессе.

В последние годы было опубликовано несколько молекулярно-филогенетических дендрограмм, охватывающих весь род *Paramecium* или несколько его морфовидов

(Strüder-Kypke et al., 2000; Hori et al., 2006; Hoshina et al., 2006). Дальнейшее сравнение геномов МАК разных видов парамеций и сопоставление данных такого анализа с филогенией рода может пролить свет на направления эволюции формирования и организации генома МАК у инфузорий.

Авторы выражают благодарность проф. Х.-Д. Гёрцу (H.-D. Görtz) и проф. Х. Шмидту (H. Schmidt) за предоставленные клоны *Paramecium*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-49504), гранта РНП 2.2.3.1.4148, грантов правительства Санкт-Петербурга (А. П. и И. Н.) и гранта Министерства образования и науки (А04-2.12-655). При выполнении работы использовано оборудование центра коллективного пользования ХРОМАС.

Список литературы

- Межевая Е. В., Бериташвили Д. Р., Степанова В. П., Яровой Б. Ф., Захаров И. А. 1990. Изучение интеграции плазмиды pYF91 в дрожжевые хромосомы методом пульс-фореза. Биополимеры и клетка. 6 (3) : 90—93.
- Некрасова И. В., Потехин А. А., Пржибош Е., Раутиан М. С. 2004. Виды-двойники комплекса *Paramecium aurelia* (Ciliophora, Protozoa): электрокаротип макронуклеуса как индивидуальная характеристика вида. Вестник ТГУ. 3 (10), Прил.: 64—68.
- Потехин А. А., Раутиан М. С., Бригге Т. 1999. Геном инфузорий *Paramecium caudatum*: анализ методом пульс-электрофореза. Генетика. 35 (12) : 1413—1420.
- Райков И. Б. 1978. Ядро простейших. Морфология и эволюция. Л.: Наука. 378 с.
- Тимофеева А. С., Раутиан М. С. 1997. Определение размера генома внутриядерной симбиотической бактерии *Holospora undulata* методом пульс-электрофореза. Цитология. 39 (7) : 634—639.
- Altschuler M. I., Yao M. C. 1985. Macronuclear DNA of *Tetrahymena thermophila* exists as defined subchromosomal-sized molecules. Nucl. Acids Res. 13 : 5817—5831.
- Aufderheide K. L., Daggett P. M., Nerad T. A. 1983. *Paramecium sonneborni* n. sp., a new member of the *Paramecium aurelia* species-complex. J. Protozool. 30 : 128—131.
- Aury J.-M., Jaillon O., Duret L., Noel B., Jubin C., Porcell B. M., Ségurens B., Daubin V., Anthouard V., Aiach N., Arnaz O., Billaut A., Beisson J., Blanc I., Bouhouche K., Câmara F., Duharcourt S., Guigo R., Gogendeau D., Katinka M., Keller A.-M., Kissmehl R., Klotz C., Koll F., Le Mouél F., Lepère G., Malinsky S., Nowacki M., Nowak J. K., Plattner H., Poulain J., Ruiz F., Serrano V., Zagulski M., Dessen P., Bétermier M., Weissenbach J., Scarpelli C., Schächter V., Sperling L., Meyer E., Cohen J., Wincker P. 2006. Global trends of whole-genome duplications revealed by the ciliate *Paramecium tetraurelia*. Nature. 444 : 171—178.
- Berger J. D. 2001. Riding the ciliate cell cycle — a thirty-five-year perspective. J. Eukaryot. Microbiol. 48 : 505—518.
- Carle G. F., Olson M. V. 1985. An electrophoretic carototype for yeast. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 82. 3756—3760.
- Caron F., Meyer E. 1989. Molecular basis of surface antigen variation in Paramecia. Annu. Rev. Microbiol. 43 : 23—42.
- Forney J., Rodkey K. 1992. A repetitive DNA sequence in *Paramecium* macronuclei is related to the beta subunit of G proteins. Nucl. Acids Res. 20 : 5397—5402.
- Gilley D., Blackburn E. H. 1994. Lack of telomere shortening during senescence of *Paramecium*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 91 : 1855—1958.
- Hori M., Tomikawa I., Przyboś E., Fujishima M. 2006. Comparison of the evolutionary distances among syngens and sibling species of *Paramecium*. Mol. Phylogenet. Evol. 38 : 697—704.

- Hoshina R., Hayashi S., Imamura N. 2006. Intraspecific genetic divergence of *Paramecium bursaria* and re-construction of the paramecian phylogenetic tree. *Acta Protozool.* 45 : 377—386.
- Jahn C. L., Klobutcher L. A. 2002. Genome remodelling in ciliated protozoa. *Annu. Rev. Microbiol.* 56 : 489—520.
- Katz L. A. 2001. Evolution of nuclear dualism in ciliates: a reanalysis in light of recent molecular data. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51 : 1587—1592.
- Lahlafi T., Méténier G. 1991. Low-molecular-weight DNA in the heteromeric macronuclei of two cyrtophorid ciliates. *Biol. Cell.* 73 : 79—88.
- 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.
- Maule J. 1996. Physical mapping by pulsed-field gel electrophoresis. *Methods Mol. Biol.* 68 : 93—121.
- Pearse A. G. E. 1960. *Histochemistry: theoretical and applied.* London: J. & A. Churchill Ltd. 998 p.
- Phan H. L., Forney J., Blackburn E. 1989. Analysis of *Paramecium* macronuclear DNA using pulsed-field gel electrophoresis. *J. Protozool.* 36 : 402—408.
- Prescott D. N. 1994. The DNA of ciliated protozoa. *Microbiol. Rev.* 58 : 233—267.
- Przyboś E. 2005. Recent data on the occurrence of species of the *Paramecium aurelia* complex in Europe. *Folia biol. (Kraków).* 53 : 61—63.
- Przyboś E., Tarcz S., Skoblo I. 2007. First American stand of *Paramecium novaurelia* and intra-specific differentiation of the species. *Folia biol. (Kraków).* 55 : 53—63.
- Rautian M. S., Potekhin A. A. 2002. Electro-karyotypes of macronuclei of several *Paramecium* species. *J. Eukaryot. Microbiol.* 49 : 296—304.
- Sonneborn T. M. 1970. Methods in *Paramecium* research. *Methods Cell Physiol.* 4 : 241—339.
- Sonneborn T. M. 1975. The *Paramecium aurelia* complex of fourteen sibling species. *Trans. Amer. Microsc. Soc.* 94 : 155—178.
- Strüder-Kypke M. C., Wright A. D. G., Fokin S. I., Lynn D. H. 2000. Phylogenetic relationships of the subclass Peniculia (Oligohymenophorea, Ciliophora) inferred from small subunit rRNA gene sequences. *J. Eukaryot. Microbiol.* 47 : 419—429.
- Sumner A. T. 1990. Chromosome banding. London; Boston: Unwin Hyman. 434 p.
- Wichtermann R. 1986. The biology of *Paramecium*. New York; London: Plenum Press. 599 p.
- Zagulski M., Nowak J. K., Le Mouél A., Nowacki M., Migdalski A., Gromadka R., Noël B., Blanc I., Dessen P., Wincker P., Keller A. M., Cohen J., Meyer E., Sperling L. 2004. High coding density on the largest *Paramecium tetraurelia* somatic chromosome. *Curr. Biol.* 14 : 1397—1404.

Поступила 11 II 2008

COMPARATIVE DESCRIPTION OF MACRONUCLEAR ELECTROPHORETIC KARYOTYPES OF *PARAMECIUM PRIMAURELIA* AND *PARAMECIUM NOVAURELIA* SIBLING SPECIES

I. V. Nekrasova,¹ A. A. Potekhin,^{1,*} E. Przybos,² M. S. Rautian¹

¹ Faculty of Biology and Soil Sciences, St. Petersburg State University, Russia,
and ² Institute of Systematics and Evolution of Animals, Polish Academy of Sciences, Krakow, Poland;
* e-mail: aurelia@fromru.com

The macronuclear genomes of two sibling species belonging to the *Paramecium aurelia* complex — *P. primaurelia* and *P. novaurelia* — were analyzed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Their electrophoretic karyotypes showed a continuous spectrum of different-sized DNA molecules with a species-specific pattern of banding, which was reproducible and did not change with strain senescence. Thus, *P. aurelia* macronuclear PFGE profiles could be described by an approach analogous to that used for the description of metaphase chromosome banding patterns. At first, well-identifiable regions (size fractions) of a PFGE profile, which can be seen at any resolution, are determined. Then, the bands of the second order of resolution (subfractions) can be defined in some of these regions. The blocks of the first and second orders can be utilized as inner markers of the PFGE profile allowing precise comparison of different PFGE profiles. Such comparative analysis has demonstrated some marking differences in organization of the macronuclear genomes of *P. primaurelia* and *P. novaurelia*, and low level of intraspecific polymorphism. Worth noting is that the *P. novaurelia* strain isolated in USA was different from all other analyzed *P. novaurelia* strains originating from Europe. The nature of banding of *P. aurelia* PFGE profiles is discussed. The revealed high order and stability of the macronuclear genome organization makes possible searching for new approaches to study the mechanisms of this non-trivial genome formation and maintenance. Further PFGE analysis of the macronuclear genomes of the other *Paramecium* species in relation with the *Paramecium* phylogeny may provide insights into the directions of the evolution of the macronuclear genome in *Ciliata*.

Key words: *Paramecium aurelia* species complex, sibling species, genome of the macronucleus, karyotype, PFGE.