

ИНДУЦИРОВАННАЯ АКТИНОМИЦИНОМ D СМЕНА ТИПА СПАРИВАНИЯ У ИНФУЗОРИИ *DILEPTUS ANSER*

© А. Л. Юдин, З. И. Успенская

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: alyudin@mail.ru

Изучали влияние актиномицина D на проявление и наследование типа спаривания (ТС) у зрелых лабораторных клонов инфузории *Dileptus anser*. У этих инфузорий каждый зрелый клон, выделенный из природной популяции, относится к одному из трех взаимокплементарных типов спаривания — ТС I, ТС II или ТС III. При дальнейшем культивировании клона в лаборатории его ТС в ряду вегетативных поколений не изменяется. Однако после обработки актиномицином D (15 мкг/мл, 3 сут) клон переходит в наследственно нестабильное по ТС состояние. При еженедельном тестировании ТС на протяжении по крайней мере 15 нед после воздействия (что соответствует более 100 клеточным делениям) у многих субклонов клона, испытывавшего воздействие актиномицина, наблюдали смену их ТС на другой и обратно, а также временное состояние незрелости или частичной зрелости. Эти данные свидетельствуют в пользу нашей гипотезы об эпигенетической детерминации ТС у *D. anser*. Учитывая, что актиномицин D вызывает также наследуемую дестабилизацию ряда признаков у амёб *Amoeba proteus*, имеющую явно эпигенетическую природу, этот антибиотик может, вероятно, рассматриваться как «эпимутаген».

Ключевые слова: инфузории, *Dileptus anser*, типы спаривания, актиномицин D, эпигенетическая изменчивость и наследование.

Принятые сокращения: АмD — актиномицин D, ТС — тип спаривания.

На протяжении ряда лет авторы (Юдин, Афонькин, 1987; Юдин, Успенская, 2006, и др.) изучают наследование и генетическую детерминацию типов спаривания у молодых, только что созревших эксконъюгатных клонов, полученных в некоторых скрещиваниях. У многих (не всех!) таких клонов довольно часто наблюдали на протяжении 1-х нед после созревания чередование состояния зрелости и состояния незрелости (или частичной зрелости) и(или) смену одного ТС на другой, иногда неоднократно. В отдельных случаях клон мог последовательно проявить все три ТС, обнаруженные у этого вида. Изменения всегда охватывали синхронно все клетки культуры — спонтанный селфинг (внутриклональной конъюгации) в таких культурах никогда не наблюдали.

Исходя из этих наблюдений предположили (Yudin, Uspenskaya, 2007a), что локус *mat*, контролирующей три ТС у дилептусов, имеет сложную, комплексную природу, наследуется как целое и может обуславливать проявление любого из возможных ТС, подобно тому, что имеет место у другой инфузории — *Tetrahymena thermophila*. Какой именно ТС будет экспрессироваться данным эксконъюгатным клоном, определяется другими механизмами, в том числе предположительно и эпигенетическими. Стабильная работа этих механизмов обуславливает стабильную, однозначную дифференцировку сложного локуса *mat* в направлении какого-то одного ТС и последующее менделирование этого признака в половых поколениях. Нарушение контроля дифференцировки в силу пока еще непонятных причин приводит к нестабильности экспрес-

сируемого ТС у созревающих эксконъюгатных клонов и нарушениям регулярного менделирования.

При этом целый ряд вопросов, связанных с этим явлением, оставались и пока остаются невыясненными. В частности, было неясно, как долго сохраняется нестабильное состояние молодых эксконъюгатных клонов, поскольку зрелые клоны дилептусов, выделенные из природы и культивируемые далее в лаборатории, при вегетативном размножении стабильно наследуют ТС (исключения настолько редки, что их, как правило, не удается надежно зарегистрировать). Нельзя было исключить, что молодые эксконъюгатные клоны, заканчивая процесс дифференцировки своего макронуклеуса, утрачивают все генетические потенции по ТС, кроме одной, стабилизируются и далее стабильно наследуют свой ТС. В этом случае макронуклеусы молодых эксконъюгатных клонов и макронуклеусы зрелых клонов в отношении признака «ТС» генетически различны, и зрелые клоны дилептусов в принципе не способны дестабилизироваться и изменять свой ТС в ряду вегетативных поколений. Напротив, если детерминация ТС имеет эпигенетическую природу, зрелые лабораторные клоны могут сохранять в своих макронуклеусах генетические потенции для всех трех ТС и в принципе способны изменять свой ТС.

Для проверки этого предположения мы попытались внешними воздействиями вызвать изменения ТС у «старых», давно ведущихся в лаборатории клонов и в качестве индуцирующего воздействия выбрали (по причинам, указанным в разделе «Обсуждение») актиномицин D

(АмD). Оказалось, что обработка дилептусов этим антибиотиком в сублетальных дозах дестабилизирует их по ТС и вызывает у них, в частности, изменения ТС, не наблюдающиеся в контроле.

Материал и методика

В работе использованы три ведущихся в лаборатории клона *Dileptus anser* № 3 (ТС I), № 13 (ТС II) и № 153 (ТС III). Клон № 3 изолирован из водоема в Санкт-Петербурге и культивируется в лаборатории с 2001 г. Такого же происхождения и клон № 13, который культивируется с 1998 г. Клон № 153 изолирован в Якутии и любезно предоставлен нам д-ром М. С. Раутиан. В лаборатории он с 2002 г. Дилептусов культивировали в массовых культурах по методике, описанной ранее (Успенская, Юдин, 2000). Актиномицин D (Sigma) разводили до рабочих концентраций 5, 10, 15 и 20 мкг/мл средой Прескотта (Prescott, Carrier, 1964). В микроаквариумы с дилептусами в среде Прескотта вносили раствор АмD той или иной концентрации в соотношении 1 : 1. Добавляя в смесь через 1 и 2 сут такой же раствор АмD, доводили концентрацию антибиотика в смеси практически до рабочей. Все это время (3 сут) дилептусы находились в растворе АмD без пищи. Затем клетки отмывали от антибиотика средой Прескотта, рассаживали поодиночке и далее культивировали субклоны, как обычно. АмD в концентрациях 5 и 10 мкг/мл не оказывал никакого видимого действия на дилептусов. Концентрация же 20 мкг/мл оказалась

токсичной — клетки теряли подвижность уже через 4—5 ч после обработки. Для дальнейшей работы была выбрана концентрация 15 мкг/мл, при которой выживали около 75 % обработанных клеток при 100%-ной выживаемости в контроле (более детальную характеристику действия АмD на дилептусов в этой концентрации см.: Успенская, Юдин, 1996).

Всего таким образом выращено по 20 субклонов каждого клона. Субклоны тестировали на тип спаривания с клетками исходных клонов еженедельно на протяжении 4 мес. Параллельно тестировали контрольные (исходные) клоны. В ходе тестирования устанавливали ТС субклона, либо его незрелость (отсутствие mating-реакции с любым из клонов-тестеров), либо так называемую частичную зрелость (mating-реакция только с одним каким-либо клоном-тестером, а не с двумя, что характерно для обычных зрелых клонов).

Результаты

Выше уже отмечалось, что выделенные из природы и культивируемые далее в лаборатории зрелые клоны дилептусов в подавляющем большинстве сохраняют свой тип спаривания неизменным на протяжении многих месяцев и даже лет наблюдения за ними. Крайне редко отмечали отклонения от этого правила, однако эти единичные наблюдения не вызвали доверия.

Соответственно использованные в настоящей работе клоны № 3 (ТС I), № 13 (ТС II) и № 153 (ТС III) сохраня-

Таблица 1

Изменения типа спаривания клона № 3 (ТС I) после воздействия актиномицином D (15 мкг/мл, 3 сут)

Субклоны клона № 3	Тип спаривания субклонов при последовательных тестированиях (недели после воздействия)							
	1—2	3—4	5—6	7—8	9—10	11—12	13—14	более 15
3—1	I	—	I	I	I		Погиб	
3—2	I	I	I	I	I	I	I	I
3—3	I	—	—	I	I	I	Погиб	
3—4	I	—	—	II	II	I	I	II
3—5	I	I			Погиб			
3—6	I	II	II	II	—		Погиб	
3—7	—	—	II	I	I	I	I	I
3—8	I	I	I	I	I	I	I	I
3—9	I	I	I	I	I	I	I	I
3—10	—	—	—	II	II	II	II	II
3—11	I	—	—	I	I	I	I	I
3—12	II	—	—			Погиб		
3—13	I	I	—	—	I	I	I	I
3—14	I	I	I	I	I	I	I	I
3—15	—	—	—	—	II	—	—	I
3—16	I	I	—	—	I	I	I	I
3—17	I	I	I	I	I	I	I	I
3—18	—	—	—	—	—	ЧЗ	II	II
3—19	I	—	—	II	—		Погиб	
3—20	I	I	I	I	I	I	I	I

Примечание. Прочерк — субклон не реагирует ни с одним из трех тест-клонов (состояние незрелости?); ЧЗ — субклон реагирует только с тест-клоном ТС III (состояние частичной зрелости?); полужирным шрифтом выделены случаи проявления ТС, не характерного для исходного клона № 3.

Таблица 2

Изменения типа спаривания клона № 13 (ТС II) после воздействия актиномицином D (15 мкг/мл, 3 сут)

Субклоны клона № 13	Тип спаривания субклонов при последовательных тестированиях (недели после воздействия)							
	1—2	3—4	5—6	7—8	9—10	11—12	13—14	более 15
13—1	II	II	II	II	II	II	II	II
13—2	—	—	II	II	II		Погиб	
13—3	II	I	—	—	—	II	II	Погиб
13—4	—	—	—	I	—	—	Погиб	
13—5	II	II	II	II	II	II	II	II
13—6	—	—	—	—	—	—	ЧЗ	II
13—7	—	—	II	—	I	I	I	I
13—8	II	—	—	II	II	II	II	II
13—9	—	I	I	I			Погиб	
13—10	—	—	II	II	II	II	Погиб	
13—11	II	—	—	I	I	I	I	I
13—12	—	—	II	I	I	I	I	I
13—13	—	II	II	I			Погиб	
13—14	II	II	II	II	II	II	II	II
13—15	—	—	—	II	I	I	II	II
13—16	—	—	—	ЧЗ			Погиб	
13—17	II	II	II	II	II	II	II	II
13—18	—	—	II	II	II	II	II	II
13—19	I	—	—	II	II	—	—	—
13—20	II	II	II	II	II	II	II	II

Примечание. Прочерк — субклон не реагирует ни с одним из трех тест-клонов (состояние незрелости?); ЧЗ — субклон реагирует только с тест-клоном ТС III (состояние частичной зрелости?); полужирным шрифтом выделены случаи проявления ТС, не характерного для исходного клона № 13.

ли свой тип спаривания на протяжении всего эксперимента, при тестировании их параллельно с подопытными субклонами (более 15 нед). То же зарегистрировано при эпизодических испытаниях этих клонов 08.04, 10.07, 12.09 и 30.10 2005 г., 09.02, 01.03 и 23.03 2006 г. и 13.04, 20.05 и 14.09.2007 г., т. е. на довольно большом отрезке времени. В более ранних наших публикациях можно найти аналогичные данные и по другим клонам.

На этом фоне иначе вели себя субклоны, испытавшие 3-суточное воздействие АмD. Так, у 13 из 20 субклонов клона № 3 (табл. 1) возникало временное, более или менее длительное состояние незрелости. 7 субклонов в 1—5 испытаниях имели ТС II, не свойственный исходному клону № 3. 6 субклонов погибли до конца наблюдений, причем у 5 из них до гибели отмечены либо временное состояние незрелости, либо изменение ТС.

Сходно вели себя субклоны клона № 13 (ТС II) (табл. 2). Здесь временный переход в состояние незрелости наблюдали у 15 из 20 субклонов. У 9 из них отмечено и изменение ТС со свойственного исходному клону ТС II на ТС I. 7 субклонов, у которых наблюдались те или иные изменения ТС, погибли до конца наблюдений.

И наконец, аналогичным образом вели себя субклоны клона № 153 (табл. 3). В этой группе у 18 из 20 субклонов отмечено более или менее продолжительное состояние незрелости. У 5 субклонов наблюдали переключение с ТС III, свойственного исходному клону, на ТС I, а у 5 — с ТС III на ТС II. 1 субклон в начале опыта был незрелым, затем некоторое время имел ТС II, затем опять был незре-

лым и в конце концов приобрел ТС I. 7 субклонов погибли до конца наблюдений; все они обнаружили те или иные изменения ТС. Таким образом, если субклоны клонов № 3 и 13 изменяли свой ТС в пределах двух возможностей (ТС I и ТС II), то субклоны клона № 153 проявляли в разное время все три возможных ТС.

Заканчивая изложение результатов эксперимента, мы можем утверждать, что АмD дестабилизирует ТС зрелых клонов дилептусов. У клонов, испытавших его воздействие в сублетальных дозах, возникает более или менее длительное состояние незрелости (частичной зрелости). Кроме того, свойственный им ТС может на более или менее продолжительное время изменяться на какой-то из возможных двух других ТС. Так, ТС клона № 3 мог изменяться с ТС I на ТС II и обратно, клона № 13 — с ТС II на ТС I и обратно, а клона № 153 — с ТС III на ТС I и на ТС II (в одном случае — и обратно). Следует особо подчеркнуть, что и временное состояние незрелости, и состояние временной экспрессии того или иного ТС, и, наконец, само состояние нестабильности у дестабилизированных клонов наследуются на протяжении десятков вегетативных поколений. В целом поведение таких обработанных АмD клонов сходно с поведением многих «молодых», только что созревших эсконъюгантных клонов, получаемых в результате скрещивания зрелых лабораторных клонов и тоже обнаруживающих нестабильность своего ТС (Успенская, Юдин, 2003; Юдин, Успенская, 2006, и др.). Пока нет оснований считать, что зрелые клоны, дестабилизированные АмD, вновь стабилизировались к концу периода наблюде-

Таблица 3

Изменения типа спаривания клона № 153 (ТС III) после воздействия актиномицином D (15 мкг/мл, 3 сут)

Субклоны клона № 153	Тип спаривания субклонов при последовательных тестированиях (недели после воздействия)							
	1—2	3—4	5—6	7—8	9—10	11—12	13—14	более 15
153—1	III	—	—	I	I		Погиб	
153—2	III	—	III	—	II	II	II	II
153—3	III	—	—	—	I	I	I	I
153—4	—	—	—	III	III	III	III	III
153—5	III	III	III	III	III	III	III	III
153—6	I	—	—	I	III	III	I	I
153—7	III	—	—	—	—	II	—	II
153—8	III	III	—	—	—		Погиб	
153—9	—	—	—	II	II	II	II	II
153—10	—	—	—	—	—		Погиб	
153—11	III	—	—	—	—		Погиб	
153—12	III	—	—	III	III	III	III	III
153—13	—	—	I	I	I	I	—	Погиб
153—14	III	—	II	II	—	—	Погиб	
153—15	—	—	III	II	—	—	II	II
153—16	III	III	III	III	III	—	—	Погиб
153—17	—	—	II	—	—	I	I	I
153—18	III	III	III	III	III	III	III	III
153—19	—	—	I	I	—	—	I	I
153—20	—	II	—	II	—	II	II	II

Примечание. Прочерк — субклон не реагирует ни с одним из трех тест-клонов (состояние незрелости?); ЧЗ — субклон реагирует только с тест-клоном ТС III (состояние частичной зрелости?); полужирным шрифтом выделены случаи проявления ТС, не характерного для исходного клона № 153.

ний за ними (более 15 нед после воздействия). Кроме того, остаются непонятными синхронность и однонаправленность изменений ТС у всех особей дестабилизированных клонов и отсутствие селфинга в них.

Обсуждение

Предложив гипотезу об эпигенетической природе детерминации ТС у *D. anser* (Yudin, Uspenskaya, 2007b), мы перечислили ряд вопросов, остающихся нерешенными даже на нынешнем, в основном феноменологическом, уровне исследования. В частности, тогда было неясно, насколько действительно стабильным является наследование ТС при вегетативном размножении зрелых лабораторных клонов или же возможно спонтанное и(или) индуцированное его изменение в ходе длительного культивирования. Проведенное нами исследование показало, что такая дестабилизация зрелых лабораторных клонов дилептусов, выражающаяся, в частности, в изменении ТС, в принципе возможна. По нашему мнению, это доказывает, что у дилептусов, стабильно воспроизводящих в ходе вегетативного размножения один какой-то ТС, в макронуклеусах сохраняются генетические потенции для проявления двух других известных у этого вида ТС — потенции, которые в определенных условиях или после определенных воздействий могут активироваться. Механизм такой активации остается неизвестным. Тот факт, что у давно культивируемых в лаборатории клонов дилептусов, неизменно экспрессирующих один из возмож-

ных ТС, в определенных условиях могут обратимо экспрессироваться и другие ТС, доказывает, по нашему мнению, что у дилептусов в период созревания дифференцировка макронуклеусов по ТС не может происходить по механизму делеций—сплайсинга ДНК сложного локуса *mat* (Orias, 1981).

По-прежнему остается непонятной наблюдаемая синхронность и однонаправленность изменений состояния клеток по ТС в пределах одной культуры, хотя разные субклональные культуры, параллельно ведущиеся в одних и тех же условиях, ведут себя несинхронно, как хорошо видно по данным табл. 2, 3. Возможно, эта синхронизация клеток в пределах одной культуры препятствует возникновению селфинга (внутриклональной конъюгации), который никогда не наблюдался нами в нестабильных культурах. Показано, что у созревающих нестабильных эксконъюгантных клонов дилептусов заметное влияние на изменение их состояния по ТС оказывает температура культивирования (Yudin, Uspenskaya, 2007a). Не исключено, что синхронизирующее действие оказывают и другие факторы, в частности феромоны спаривания, выделяемые зрелыми дилептусами в среду (Юдин и др., 1990). В связи с этим можно отметить, что, хотя наследование ТС у инфузории *Euplotes raikovi* является формально генным, его изменения могут происходить в результате действия гетерологичных феромонов спаривания на незрелые в половом отношении клетки (Luporini, Miceli, 1984).

Весьма интересно, на наш взгляд, что АмД является индуктором наследуемой нестабильности по целому ряду контролируемых ядром признаков также и у совсем дру-

гих простейших — у амёб *Amoeba proteus*. Наследуемую нестабильность у этих амёб, обнаруженную первоначально как результат межъядерного взаимодействия в клетках-гетерокарионах (Калинина, Юдин, 1964) и по многим критериям имеющую эпигенетическую природу (Юдин, 1981), оказалось возможным индуцировать в эксперименте многими, весьма разнообразными агентами, в том числе и не являющимися мутагенами в общепринятом смысле (Юдин, 1981). Среди этих агентов оказался, в частности, АмД (Калинина, 1968; Оленов, 1970а, 1970б; Юдин, 1979). Известно, что этот антибиотик если и является мутагеном, то, во всяком случае, слабым (см., например: Fishbein et al., 1970; мы не нашли также сведений об особой мутагенной активности АмД в недавнем, очень обстоятельном обзоре: Koba, Konopa, 2005). Тем не менее он с высокой частотой вызывает эпигенетические изменения у столь разных организмов, как амёбы *Amoeba proteus* и инфузории *Dileptus anser*, что позволяет считать его специфическим индуктором эпигенетических изменений (по крайней мере некоторых их типов), или «эпимутагеном».

Что касается возможных молекулярных механизмов эпимутагенного действия АмД, то вопрос этот, очевидно, неразрывно связан с вопросом о молекулярных механизмах эпигенетической дифференцировки и трансдифференцировки по ТС у амёб и *D. anser*, которые пока что остаются неизвестными.

Авторы благодарят Ю. Я. Соколову за полученную от нее упаковку актиномицина D (Sigma) и С. Ю. Хайтлину за перевод обзора по актиномицину D.

Список литературы

- Калинина Л. В. 1968. Наследуемые изменения, вызываемые у амёб действием актиномицина D. Цитология. 10 (12) : 1589—1597.
- Калинина Л. В., Юдин А. Л. 1964. Генетическое взаимодействие ядер в гетерокарионах у амёб. Цитология. 66 (6) : 695—709.
- Оленов Ю. М. 1970а. Эпигеномная изменчивость. Онтогенез. 1 (1) : 10—16.
- Оленов Ю. М. 1970б. О генетических механизмах дифференцировки клеток. Цитология. 12 (1) : 3—21.
- Успенская З. И., Юдин А. Л. 1996. Влияние актиномицина D на процесс трансформации серотипа у инфузории *Dileptus anser*. Генетика. 32 (3) : 379—385.
- Успенская З. И., Юдин А. Л. 2000. Наследование серотипов в эксконъюгантном потомстве инфузории *Dileptus anser*. Цитология. 42 (11) : 1103—1110.
- Успенская З. И., Юдин А. Л. 2003. Типы спаривания у инфузории *Dileptus anser*. Генетическая нестабильность в системе типов спаривания. Цитология. 45 (5) : 510—514.
- Юдин А. Л. 1979. Механизмы дестабилизации наследственных признаков у амёб. II. Наследуемые изменения, индуцируемые некоторыми антибиотиками. Acta protozool. 18 (4) : 571—579.
- Юдин А. Л. 1981. Ядерно-цитоплазматические взаимоотношения и клеточная наследственность у амёб. Л.: Наука. 200 с.
- Юдин А. Л., Афонькин С. Ю. 1987. Генетическая детерминация и наследование типов спаривания у инфузории *Dileptus anser* (Gymnostomatida, Holotricha). В кн.: Современные проблемы протозологии. Л.: Наука. 32.
- Юдин А. Л., Успенская З. И. 2006. Типы спаривания у инфузории *Dileptus anser*. Наследование и генетическая детерминация. Цитология. 48 (4) : 364—374.
- Юдин А. Л., Афонькин С. Ю., Парфенова Е. В. 1990. Феромоны спаривания у инфузории *Dileptus anser*. Цитология. 32 (2) : 107—116.
- Fishbein L., Flamm W. G., Falk H. L. 1970. Chemical mutagens. New York; London: Acad. Press. 364 p.
- Koba M., Konopa J. 2005. Actinomycin D and its mechanisms of action. Postepy Hig. Med. Dosw. 59 : 290—298. (Польск., англ. рез.).
- Luporini P., Miceli C. 1984. Cell-cell communication in the preconjugal interaction of *Euplotes*: a hypothesis on the molecular mechanism of control. Protistologica. 20 : 371—376.
- Orias E. 1981. Probable somatic DNA rearrangements in mating type determination in *Tetrahymena thermophila*: a review and a model. Develop. Genet. 2 : 185—202.
- Prescott D. M., Carrier R. F. 1964. Experimental procedures and cultural methods for *Euplotes eurystomus* and *Amoeba proteus*. In: Methods in cell physiology. New York; London: Acad. Press. 1 : 85—95.
- Wirnsberger E., Foissner W., Adam H. 1984. Morphologie und Infraciliatur von *Perispira pyriformis* nov. spec., *Cranotheridium foliosus* (Foissner, 1983) nov. comb. und *Dileptus anser* (O. F. Müller, 1786) (Protozoa, Ciliophora). Arch. Protistenk. 128 : 305—317.
- Yudin A. L., Uspenskaya Z. I. 2007a. The effect of cultivation temperature on differentiation for mating type in exconjugant clones of the ciliate *Dileptus anser*. Protistology. 4 : 347—352.
- Yudin A. L., Uspenskaya Z. I. 2007b. Nuclear differentiation for mating types in the ciliate *Dileptus anser*: a hypothesis. Cell Biol. Internat. 31 : 428—432.

Поступила 25 VI 2008

CHANGE OF MATING TYPE INDUCED BY ACTINOMYCIN IN THE CILIATE *DILEPTUS ANSER*

A. L. Yudin, Z. I. Uspenskaya

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; e-mail: alyudin@mail.ru

Effect of actinomycin D on the expression and inheritance of mating types (MTs) in mature laboratory clones of the ciliate *Dileptus anser* was studied. Each mature clone of these ciliates isolated from natural population appears to belong to one of the three complementary MTs — MT I, MT II or MT III. Its MT does not vary in the course of further laboratory cultivation of the clone in a series of vegetative generations. However, after treatment with actinomycin D (15 µg/ml, 3 days), such clones became hereditarily unstable for their MTs. At weekly testing for MT over the course of at least 15 weeks after treatment (which corresponds to more than 100 cellular divisions), many subclones of the treated clone reversibly changed their MT for another, and (or) showed temporary state of immaturity or partial maturity. These data testify in favour of our hypothesis of epigenetic MT determination in *D. anser*. Considering that actinomycin D induces heritable destabilization of some characters in amebas *Amoeba proteus* which is obviously of epigenetic nature, this antibiotic can possibly be regarded as «epimutagen».