



<https://doi.org/10.17816/ecogen172113-125>

РАЗНООБРАЗИЕ ПУТЕЙ ИНТЕРФЕРЕНЦИИ РНК В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ЭНДОГЕННЫХ И ЭКЗОГЕННЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ У ИНFUЗОРИЙ *TETRAHYMENA* И *PARAMECIUM*

© И.В. Некрасова, А.А. Потехин

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург

Для цитирования: Некрасова И.В., Потехин А.А. Разнообразие путей интерференции РНК в регуляции экспрессии эндогенных и экзогенных последовательностей у инфузорий *Tetrahymena* и *Paramecium* // Экологическая генетика. – 2019. – Т. 17. – № 2. – С. 113–125. <https://doi.org/10.17816/ecogen172113-125>.

Поступила: 26.10.2018

Одобрена: 04.02.2019

Принята: 17.06.2019

☼ Интерференция РНК играет огромную роль в биологии инфузорий. Разнообразные малые РНК регулируют многие процессы в жизни вегетативных клеток инфузорий *Tetrahymena* и *Paramecium*. Разные типы эндогенных и экзогенных нуклеотидных последовательностей запускают разные пути интерференции РНК, приводящие к сайленсингу гомологичных последовательностей в геноме макронуклеуса. Вероятно, благодаря этим молекулярным механизмам инфузории способны быстро инактивировать чужеродные гены и эффективно адаптироваться к условиям среды обитания и внешним стимулам.

☼ **Ключевые слова:** инфузории; интерференция РНК; малые РНК; Dicer; Piwi; РНК-зависимые РНК-полимеразы; сайленсинг генов.

DIVERSITY OF RNA INTERFERENCE PATHWAYS IN REGULATION OF ENDOGENOUS AND EXOGENOUS SEQUENCES EXPRESSION IN CILIATES *TETRAHYMENA* AND *PARAMECIUM*

© I.V. Nekrasova, A.A. Potekhin

Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

For citation: Nekrasova IV, Potekhin AA.

Diversity of RNA interference pathways in regulation of endogenous and exogenous sequences expression in ciliates *Tetrahymena* and *Paramecium*. *Ecological genetics*. 2019;17(2):113-125. <https://doi.org/10.17816/ecogen172113-125>.

Received: 26.10.2018

Revised: 04.02.2019

Accepted: 17.06.2019

☼ RNA interference plays a major role in biology of ciliates. Diverse small RNAs regulate many processes in vegetative cells of ciliates *Tetrahymena* and *Paramecium*. Different types of endogenous and exogenous nucleotide sequences induce different RNAi pathways resulting in silencing of the homologous sequences in the macronuclear genome. Likely this way ciliates are able to quickly inactivate heterogeneous sequences and to adapt efficiently to the environmental conditions and external stimuli.

☼ **Keywords:** ciliates; RNA interference; small RNAs; Dicer; Piwi; RNA-dependent RNA polymerases; gene silencing.

Сайленсинг генов, опосредованный работой малых РНК, играет важную роль в регуляции различных процессов у большинства эукариот [1]. Роль двуцепочечных РНК (дцРНК) в инактивации генов впервые была показана на нематоде *Caenorhabditis elegans*, и этот механизм получил название «интерференция РНК» [2]. В настоящее время термином «интерференция РНК» обозначают любой сайленсинг генов, в который включены молекулы дцРНК того или иного рода [3] (рис. 1). Ферменты семейства Dicer разрезают молекулы дцРНК на малые интерферирующие РНК (small interfering RNAs, siРНК), которые затем образуют комплексы с белками семейства Argonaute/Piwi. В этих ком-

плексах малые РНК становятся одонитевыми, вторая цепь подвергается деградации. Выделяют два вида таких комплексов: RISC (RNA-Induced Silencing Complex) и RITS (RNA-Induced Transcriptional Silencing). Комплексы RISC распознают мРНК-мишени, гомологичные малым РНК, входящим в их состав, и вызывают их деградацию. Малые же РНК, входящие в состав комплексов RITS, нацеливают их на гомологичные участки ДНК, в результате чего в этих участках происходит модификация хроматина (см. рис. 1). Таким образом, сайленсинг может осуществляться как на транскрипционном, так и на посттранскрипционном уровне за счет деградации мРНК [3].

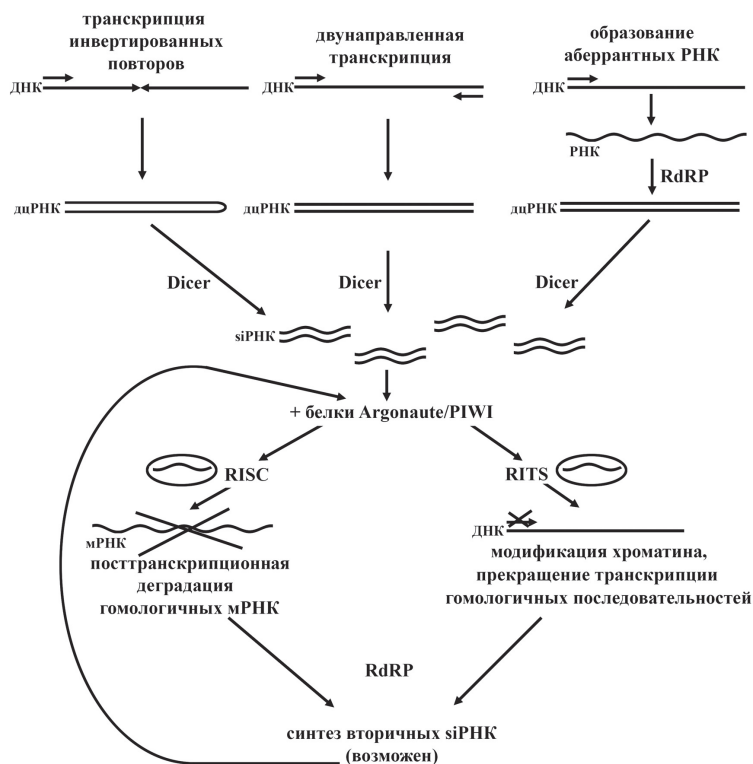


Рис. 1. Общая схема путей интерференции РНК. дцРНК — двуцепочечная РНК; RdRP — РНК-зависимая РНК-полимераза; комплексы малых РНК и белков: RISC — RNA-Induced Silencing Complex, RITS — RNA-Induced Transcriptional Silencing

Fig. 1. General scheme of RNA interference pathways. дцРНК — double-stranded RNA; RdRP — RNA-dependent RNA polymerase; complexes of small RNAs and proteins: RISC — RNA-Induced Silencing Complex, RITS — RNA-Induced Transcriptional Silencing

Предполагают, что исходно главной функцией интерференции РНК была защита от репликации и экспансии чужеродных последовательностей, таких как транспозоны и вирусы [1]. Основные белки, задействованные в интерференции РНК, возникли, по-видимому, уже у общего предка всех эукариот, имевшего как минимум один белок Argonaute, один белок Piwi, одну нуклеазу Dicer и одну РНК-зависимую РНК-полимеразу (RNA-dependent RNA polymerase, RdRP) [1]. Белки этих семейств обнаружены у большинства эукариот и характеризуются высокой консервативностью. У наиболее изученных инфузорий, *Paramecium tetraurelia* и *Tetrahymena thermophila* (они относятся к одному классу Oligohymenophorea), пути интерференции РНК разнообразны, и их обслуживает целый набор разных белков этих семейств, лишь белки Argonaute у инфузорий отсутствуют. Наиболее изученным и эффективным вариантом реализации механизма интерференции РНК в клетках этих протистов является геномное сканирование — формирование соматического генома при половом процессе, когда из развивающегося макронуклеуса удаляются практически все некодирующие последовательности ДНК [4]. В клетках инфузорий одновременно присутствуют ядра двух типов, мультигеномный макронуклеус (МАК) — соматическое ядро, гены которого экспрессируются, и генеративный, обычно диплоидный микронуклеус (МИК), отвечающий за хранение генетической информации и передачу ее потомству при половом процессе. Если в геноме МИК *Paramecium* и *Tetrahymena* примерно 30 % ДНК представлено некодирующими повторами, транспозонами и их дериватами, а содержа-

щиеся там гены не экспрессируются, то в геноме МАК находятся исключительно необходимые для жизнедеятельности инфузории последовательности ДНК. При половом процессе МАК инфузорий разрушается, а из продуктов мейоза МИК формируется зиготическое ядро — синкарион, при делениях которого образуются зачатки новых МИК и МАК. Формированием генома МАК управляют сложные эпигенетические механизмы, в основе которых лежит интерференция РНК [5, 6]. При этом из формирующегося соматического генома удаляется большая часть некодирующих последовательностей, транспозонов и их производных, IES (internal eliminated sequences) с последующим сшиванием фланкирующих их участков, и происходит фрагментация хромосом на короткие, не имеющие центромер «мини-хромосомы», к которым *de novo* достраиваются теломерные повторы [4]. Удаление всех некодирующих последовательностей при формировании соматического генома во время полового процесса представляет собой первый этап защиты инфузорий от «лишних» последовательностей, — накапливаясь в молчащем, невидимом для отбора геноме генеративного ядра, они очень эффективно удаляются из генома соматического.

Однако вне полового процесса у инфузорий функционируют иные пути интерференции РНК. И у *Paramecium*, и у *Tetrahymena* в эти пути и в механизмы геномного сканирования вовлечены разные представители семейств белков Dicer и Piwi [7–9]. Данный обзор посвящен тем феноменам биологии двух модельных видов, *P. tetraurelia* и *T. thermophila*, которые связаны с действием механизма интерференции РНК в вегетативных клетках.

ПЕРВИЧНЫЕ И ВТОРИЧНЫЕ МАЛЫЕ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ РНК ИНФУЗОРИЙ

В вегетативных клетках инфузорий постоянно синтезируются и присутствуют siРНК, которые могут быть первичными или вторичными и различаться по размеру и модификациям. Их функции пока до конца не ясны, но очевидно, что для инфузорий siРНК — это одни из основных регуляторов экспрессии генов. Так, в клетках тетрахимен всегда присутствуют siРНК длиной 23–24 н., которые являются антисмысловыми для генов МАК [10]. Введение в клетки

T. thermophila методом электропорации трансгенной последовательности, с которой транскрибируются гомологичные тому или иному гену формирующие двунитевые шпильки молекулы РНК, вызывает накопление 23–24 н. siРНК и значительное снижение количества мРНК гомологичных эндогенных последовательностей [11]. Как и большинство siРНК, микроРНК и piРНК других эукариот, эти малые РНК почти всегда содержат U на 5'-конце, и для половины этих siРНК 3'-концевой нуклеотид, обычно тоже U, видимо, добавляется внематрично [10] (рис. 2).

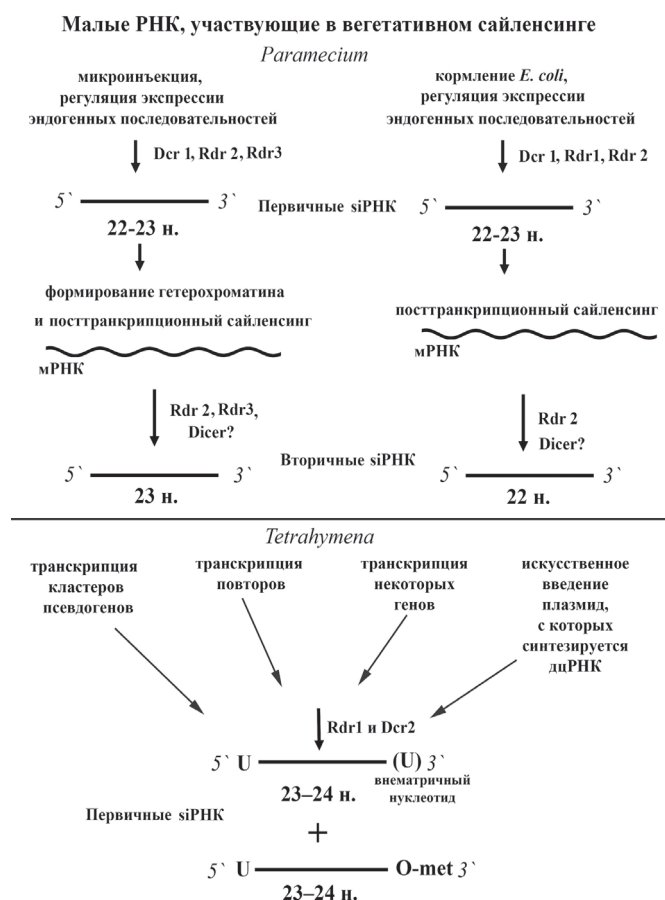


Рис. 2. Разновидности малых РНК, участвующих в сайленсинге в вегетативных клетках у парамеций и тетрахимен. У парамеций малые РНК, участвующие в сайленсинге в вегетативных клетках, представлены первичными siРНК, образующимися с помощью белка Dcr1 и РНК-зависимых РНК-полимераз Rdr1, Rdr2 и Rdr3, и вторичными siРНК. При кормлении инфузорий продуцирующими dsРНК *E. coli* вторичные siРНК синтезируются ферментом Rdr2 на матрице мРНК вследствие взаимодействия мРНК с первичными siРНК. В случае индукции сайленсинга микроинъекцией трансгенов в синтез вторичных siРНК вовлечены полимеразы Rdr2 и Rdr 3, а также предположительно белки Dicer. При регуляции экспрессии собственных эндогенных последовательностей парамеции, по-видимому, используют оба пути. У тетрахимен сайленсинг в вегетативных клетках запускают как эндогенные последовательности, в том числе псевдогены, разные типы повторов и некоторые гены, так и искусственно введенные векторы. Во всех случаях за счет работы белков Rdr1 и Dcr2 образуются малые РНК, 3'-конец которых может содержать метилированную рибозу или внематрично добавленный уридин (U)

Fig. 2. Small RNAs involved in gene silencing in *Paramecium* and *Tetrahymena* vegetative cells. In *Paramecium* such small RNAs are subdivided into primary siRNAs produced by Dcr1p and RNA dependent RNA polymerases Rdr1p, Rdr2p, and Rdr3p, and secondary siRNAs. Induced by feeding with dsRNA-producing *E. coli* secondary siRNAs are synthesized by Rdr2p, which utilizes as template mRNA interacting with primary siRNAs. When silencing is induced by transgene microinjection, secondary siRNAs are produced not only by Rdr2p and Rdr3p, but also Dicer proteins are probably involved. Both pathways are likely to function when *Paramecium* regulates expression of endogenous genes. In *Tetrahymena* vegetative silencing may be induced by endogenous sequences, such as pseudogenes, repeats of different kinds, some genes, and also by exogenous vectors. In all cases Rdr1p and Dcr2p produce small RNAs, which possess methylated ribose or non-template U at 3'-ends

У парамеций путь интерференции РНК в вегетативных клетках может быть искусственно запущен несколькими способами: микроинъекцией большого числа копий трансгенной последовательности, что приводит к появлению aberrантных транскриптов с обеих цепей введенного трансгена, или микроинъекцией плазмид, с которых транскрибируется нетранслируемая дцРНК [12, 13], или кормлением инфузорий бактериями *Escherichia coli*, продуцирующими дцРНК (так называемый feeding) [14, 15]. В последнем случае нужную последовательность клонируют в вектор между направленными навстречу друг другу промоторами T7 и трансформируют им *E. coli*, которые затем при индукции IPTG усилительно продуцируют дцРНК. Если инфузории питаются такими *E. coli*, то дцРНК неизвестным образом стимулируют сайленсинг комплементарных последовательностей парамеций [16]. Как при сайленсинге, вызываемом инъекцией, так и при сайленсинге, вызываемом кормлением, siРНК образуются из дцРНК под действием белка Dcr1, одного из белков Dicer *P. tetraurelia* (см. ниже). Подробное изучение siРНК, образующихся при микроинъекции очищенных трансгенных последовательностей или плазмид с трансгенами в качестве вставок и при кормлении, показало, что их характеристики и механизм синтеза различаются в зависимости от того, как именно синтез был запущен [14, 17, 18] (см. рис. 2). Например, белки Rdr3 и Ptiwi14 участвуют в трансген-индуцированном, но не в дцРНК-индуцированном сайленсинге [7, 14].

При кормлении у *P. tetraurelia* формируются первичные siРНК длиной 23 н. с обеих цепей введенного РНК-дуплекса. Первичные siРНК составляют около 96 % всех малых РНК, образующихся при кормлении [17], в их накоплении участвуют РНК-зависимые РНК-полимеразы Rdr1 и Rdr2 (см. ниже). Роль RDRP в этом процессе остается не вполне очевидной, так как предполагается, что дцРНК сразу расщепляются ферментом Dicer с образованием siРНК. Возможно, она заключается в увеличении количества дцРНК. Возможно также, что РНК поступают из пищеварительных вакуолей в цитоплазму в одноцепочечном состоянии, а превращаются в дцРНК в результате работы RdRP [17]. При введении трансгена образуются первичные siРНК размером 22–23 н. (см. рис. 2), что приводит к сайленсингу гомологичного эндогенного гена [12, 14]. Интересно, что при введении трансгенов идет их двунаправленная транскрипция, причем на антипараллельных транскриптах запускаются разные способы синтеза siРНК: белки Rdr2 и Cid2 (см. ниже) отвечают за синтез антисмысловых РНК на матрице сплайсированных мРНК, а синтез siРНК с «бессмысленных» транскриптов предположительно производит Rdr3 [18]. Некоторые первичные siРНК гомологичны фрагментам вектора. Доля первичных siРНК при микроинъекции составляет 95–99 %. Известно, что белки Dcr1 и Rdr3

также вовлечены в сайленсинг генов поверхностных антигенов, то есть участвуют и в регуляции экспрессии эндогенных последовательностей, не связанной с инъекцией трансгена [18].

Затем появляются вторичные siРНК, синтезируемые уже на матрице эндогенных последовательностей. Вторичные siРНК образуются как продолжение каскада, начатого с появлением первичных siРНК, и это не обязательно связано с гиперэкспрессией трансгена. Даже небольшого числа aberrантных нетранслируемых транскриптов может быть достаточно для запуска этого механизма; теоретически такой каскад могут запускать и фоновые транскрибирующиеся псевдогены или другие эндогенные последовательности. Вторичные siРНК *P. tetraurelia* имеют длину 22–23 н. [14], и за их синтез отвечают RDRP. Однозначного ответа на вопрос, как именно синтезируются вторичные siРНК у *Paramecium*, на данный момент не существует. Сходство в структуре первичных и вторичных siРНК при трансген-индуцированном сайленсинге может говорить о том, что механизмы их синтеза очень похожи [18]. По-видимому, как в случае трансген-индуцированного сайленсинга, так и в случае сайленсинга, вызванного кормлением, вторичные siРНК образуются на матрице мРНК, так как они гомологичны участкам последовательности, выходящим за пределы введенного трансгена или вставки в плазмиду, используемую для кормления [17, 18], но конкретный механизм их образования остается неизвестным. Отличительной чертой трансген-индуцированных вторичных siРНК является метилирование 3'-концевой рибозы и наличие монофосфата на 5'-конце [14], что означает, что в их синтез вовлечены не только RDRP, но и белки Dicer [14]. Таким образом, можно предполагать, что на матрице мРНК синтезируются длинные дцРНК, которые затем служат субстратом для белка Dicer. В то же время количество вторичных siРНК при кормлении не снижалось при дисфункции белка Dcr1 [17], что может свидетельствовать в пользу Dicer-независимого способа синтеза вторичных siРНК на матрице мРНК. Вторичные siРНК составляют лишь 1–5 % всех siРНК, но зато они гомологичны всей последовательности мРНК-мишени, включая 3'-UTR, а не только трансгенно введенной короткой последовательности. Конкретная функция вторичных siРНК в клетке парамеций остается не вполне понятной. Их количество очень мало по сравнению с первичными siРНК, и их роль в установлении искусственно индуцируемого сайленсинга незначительна [17]. Вопрос о синтезе вторичных siРНК при индукции сайленсинга в вегетативных клетках тетрахимен пока не изучен.

Для трансген-индуцированного сайленсинга показано, что siРНК обеспечивают как посттранскрипционный сайленсинг, для которого необходимы белки Dcr1, Rdr2, Ptiwi13 и Cid2, так и котранскрипционный сайленсинг, связанный с установлением гетерохроматиновых меток

(для него необходимы белки Rdr3 и Ptiwi14, а также белки, участвующие в посттранскрипционном сайленсинге). Возможно, что оба типа сайленсинга частично перекрываются, индуцируя друг друга [18].

БЕЛКИ СЕМЕЙСТВА DICER В ВЕГЕТАТИВНЫХ КЛЕТКАХ ИНФУЗОРИЙ

Белки семейства Dicer относятся к РНКазам типа III и могут иметь до шести доменов, причем у разных эукариот те или иные домены этих белков могут отсутствовать. Однако наличие двух доменов, обладающих активностью РНКазы III, является консервативной чертой практически для всех эукариот [1]. Эти белки разрезают дцРНК с образованием коротких (21–28 п. н.) дуплексных молекул с концевыми двухнуклеотидными выступами и монофосфатным остатком на 5'-конце [19]. У *T. thermophila* обнаружено три белка семейства Dicer. Ген *DCR1* экспрессируется постоянно, но максимальный уровень экспрессии *DCR1* наступает при голодании клеток, предшествующем вступлению в половой процесс — конъюгации [10]. При этом нарушение функции белка Dcr1 фенотипически не проявляется [20], оба домена РНКазы III у Dcr1 сильно изменены, и, судя по всему, Dcr1 у *Tetrahymena* каталитически неактивен. Главная функция Dicer-подобного белка тетрахимен Dcl1 состоит в образовании малых РНК, отвечающих за формирование соматического генома при половом процессе [6, 20, 21]. Его ген максимально экспрессируется в конъюгирующих клетках [10, 20]. Белок Dcr2 содержит хеликазный домен и два домена РНКазы III [10, 20], его ген экспрессируется конститутивно, а сам белок необходим для вегетативного роста клеток [20]. Именно белок Dcr2 вовлечен в сайленсинг генов в вегетативных клетках *T. thermophila*.

В эволюции рода *Paramecium* имели место как минимум три полные дубликации генома, две последние из которых произошли непосредственно перед дивергенцией видов-двойников комплекса *P. aurelia* [22], в связи с чем многие гены в геноме *P. tetraurelia* представлены группами онологов (копий, появившихся в результате полных дубликаций генома), насчитывающими максимально до восьми членов. В том числе в геноме *P. tetraurelia* обнаружено восемь генов, кодирующих белки с доменами РНКазы III [23, 24], причем, по-видимому, все гены семейства Dicer у *P. tetraurelia* произошли от одного предкового гена [22]. Три из восьми генов (*DCR1*, *DCR2*, *DCR3*) содержат по два домена РНКазы III и по два хеликазных субдомена, то есть кодируют типичные белки Dicer [8]. Единственным каталитически активным белком Dicer у парамеций является белок Dcr1. У двух других белков Dcr домены РНКазы сильно изменены, и фенотипически нокаут их генов не проявляется. Ген *DCR1* у *P. tetraurelia* экспрессируется на протяжении всего клеточного цикла, и его нокаут приводит к нарушению синтеза ма-

лых РНК размером 23 н., участвующих в вегетативном сайленсинге у парамеций [8]. В геноме *P. tetraurelia* также есть еще пять генов, кодирующих Dicer-подобные белки, содержащие только домен РНКазы — Dcl1-Dcl5 [8]. Функции двух из них, Dcl1 и Dcl4, не установлены, их гены *DCL1* и *DCL4* на низком уровне экспрессируются на протяжении всего вегетативного роста клетки [23]. Dicer-подобные белки Dcl2, Dcl3 и Dcl5 отвечают за продукцию малых РНК, обеспечивающих реорганизацию ядерного аппарата при половом процессе [6, 8, 23]. Таким образом, подобно белку Dcr2 у тетрахимен, единственный белок семейства Dicer, отвечающий за сайленсинг генов в вегетативных клетках у *P. tetraurelia*, — это Dcr1.

РОЛЬ РНК-ЗАВИСИМЫХ РНК-ПОЛИМЕРАЗ В ВЕГЕТАТИВНОМ САЙЛЕНСИНГЕ

РНК-зависимые РНК-полимеразы существуют не только у РНК-содержащих вирусов; было обнаружено, что у разных эукариот эти ферменты обеспечивают усиление сайленсинга за счет амплификации siРНК [25]. В геноме *T. thermophila* содержится только один ген *RDR*, конститутивно экспрессирующийся на протяжении всего жизненного цикла [26]. Этот ген кодирует полимеразу Rdr1 и является жизненно важным [26]. Данная RDRP синтезирует длинные дцРНК, которые затем нарезаются ферментом Dcr2 на малые РНК размером 23 и 24 н. [26]. Rdr1 и Dcr2 физически ассоциированы друг с другом, что стимулирует активность Dcr2 [26]. Кроме того, Rdr1 *T. thermophila*, как и все RDRP, образует комплексы (RDRC, RNA-directed RNA-polymerase complexes), взаимодействуя с различными вспомогательными белками (табл. 1, рис. 3).

Было идентифицировано четыре основных белка, которые могут входить в состав этих комплексов [27]. Два белка-паралога Rdn1 и Rdn2 (Rdr1-associated nucleotidyl transferases) имеют гомологию с поли(А)-полимеразами [27] и катализируют внематричное добавление уридина к РНК-субстратам *in vitro* [27]. Интересно, что паттерн экспрессии их генов различается: *RDN1* экспрессируется на протяжении всего жизненного цикла как в вегетативной фазе, так и при конъюгации, а вот уровень экспрессии *RDN2* максимален во время конъюгации, когда уровень экспрессии *RDN1* относительно низок. Два других ассоциированных с Rdr1 белка, не имеющие доменов с определенными функциями, были названы Rdf1 и Rdf2 (Rdr1-associated factors). Гены, их кодирующие, располагаются в геноме в тандеме, что говорит об их происхождении в результате дубликации. Паттерны их экспрессии также различаются: уровень экспрессии *RDF2* максимален при вегетативном росте и снижается во время конъюгации, в то время как *RDF1* максимально экспрессируется во время конъюгации и значительно слабее в вегетативных клетках.

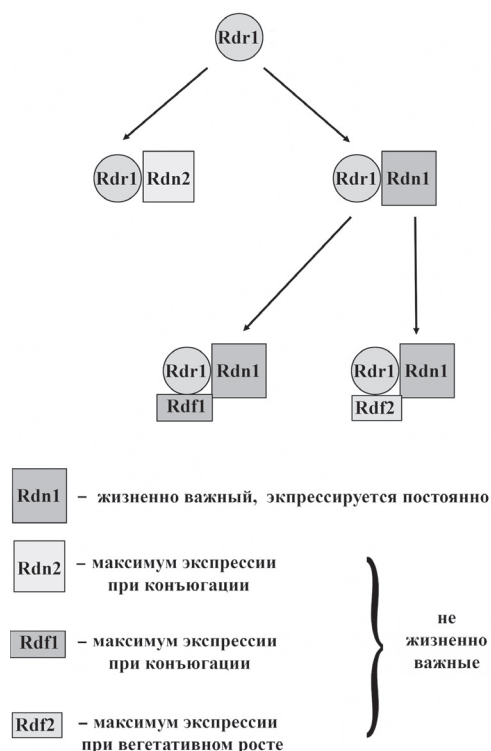


Рис. 3. Варианты комплексов, образуемых РНК-зависимой РНК-полимеразой *T. thermophila* Rdr1p со вспомогательными белками Rdn1p, Rdn2p, Rdf1p и Rdf2p

Fig. 3. Possible complexes between RDRP of *T. thermophila* Rdr1p and accessory proteins Rdn1p, Rdn2p, Rdf1p, and Rdf2p

Как оказалось, белки Rdn1 и Rdn2 входят в состав разных RDRP, и только комплексы, содержащие Rdn1, могут рекрутировать в свой состав и белки Rdf1 и Rdf2 [27]. Таким образом белок Rdr1 *T. thermophila* может образовывать несколько различных комплексов за счет взаимоисключающего взаимодействия Rdr1 с одной из двух нуклеотидилтрансфераз. *In vitro* функции всех этих комплексов не удается различить, но нокауты тех или иных отдельных компонентов по-разному сказываются на фенотипе [27]. Так, *in vitro* комплексы, содержащие Rdn1 или Rdn2, имеют сходную активность: оба комплекса могут взаимодействовать с белком Dcr2 и способствовать разрезанию им РНК с образованием siРНК размером 24 н. При этом утрата субъединицы Rdn2 приводит *in vivo* к нарушению аккумуляции определенных siРНК, а утрата Rdf2 препятствует накоплению других siРНК. Потеря Rdf1 или Rdf2 сказывается на распределении ДНК при клеточных делениях, а нокаут *RDN2* или *RDF1* блокирует конъюгацию. Как видно, несмотря на то, что *in vitro* Rdn1 и Rdn2 имеют сходную биохимическую активность, их роли *in vivo* сильно различаются. Одной из возможных функций белков Rdn1 и Rdn2 *T. thermophila* может

быть уридилирование одноцепочечных РНК-матриц для Rdr1, что может усилить специфичность за счет стабилизации 3'-конца РНК, или же Rdn1 и Rdn2 могут работать на дуплексах siРНК, так как половина малых РНК 23–24 п. н. имеет нематричный уридин на 3'-конце [27].

У *P. tetraurelia* существует четыре гена, кодирующих RDRP. Было показано, что полимеразы Rdr1 вовлечены в сайленсинг, вызванный кормлением [14], фермент Rdr2 необходим для синтеза siРНК как при сайленсинге, обусловленном кормлением, так и при сайленсинге в ответ на инъекцию трансгенов [17, 24], в то время как функция Rdr3 — синтез siРНК при сайленсинге, вызванном инъекцией плазмид, с которых считывается дцРНК [14, 24] (см. рис. 2); этот фермент участвует и в регуляции экспрессии генов поверхностных антигенов (ПАГ) [14]. *RDR4*, возможно, является псевдогеном, на что указывает крайне низкий уровень его экспрессии и полное отсутствие фенотипических проявлений его сайленсинга. Гены *RDR1* и *RDR4* — паралоги, возникшие после второй полной дупликации генома [14]. Подробный анализ последовательностей аминокислот четырех RDRP парамеций показал, что по сравнению с известными RDRP других организмов Rdr1 и Rdr2 парамеций более консервативны и очень близки к белку Rdr1 *T. thermophila* (см. табл. 1). Гены *RDR1* и *RDR2* экспрессируются на низком уровне в течение вегетативной фазы жизненного цикла. Непосредственно за синтез первичных siРНК отвечает белок Dcr1. Резкое уменьшение количества Dcr1 или белков Rdr1 и Rdr2 приводит к нарушению аккумуляции siРНК длиной 23 н. [8]. Причины, по которым для их образования необходимы помимо Dicer еще и две разные RDRP, остаются не вполне понятными. Возможно, RDRP необходимы для амплификации триггерной дцРНК, если она поступает из пищевых вакуолей в цитоплазму в очень малых количествах. Или бактериальные РНК импортируются из пищевых вакуолей в одноцепочечной форме, и тогда роль RDRP может заключаться в синтезе комплементарной второй цепи для запуска интерференции РНК [17]. Кроме того, возможно, Rdr1 играет структурную роль, взаимодействуя, например, с Dcr1, как это происходит у *Tetrahymena* (см. выше).

У *P. tetraurelia* был обнаружен ген [24], кодирующий белок семейства неканонических поли(A/U)-нуклеотидилтрансфераз, открытых у *S. pombe*, у которых один из этих ферментов, Cid1, вовлечен в интерференцию РНК. Этот ген *P. tetraurelia*, названный *CID1*, является ортологом гена *RDN2 T. thermophila*. *CID1* экспрессируется на постоянном уровне на протяжении всего клеточного цикла парамеций [24]. Его нокаут лишает клетки способности к интерференции РНК, индуцированной экзогенными РНК, но при этом нуль-мутанты по *CID1* абсолютно жизнеспособны на протяжении всего кле-

Таблица 1 / Table 1

Белки вегетативного сайленсинга RDRP и Dicer у *Tetrahymena* и *Paramecium* [по 8, 14, 17, 20, 24, 26, 27]
 RDRPs and Dicer proteins involved in vegetative silencing in *Tetrahymena* and *Paramecium* [по 8, 14, 17, 20, 24, 26, 27]

Гомолог у <i>Tetrahymena</i>	Функция у <i>Tetrahymena</i>	С какими белками взаимодействует	Гомолог у <i>Paramecium</i>	Функция у <i>Paramecium</i>	С какими белками взаимодействует
Rdr1p	Синтез siРНК; жизненно важный	Dcr2, Rdn1 и Rdn2, Rdf1 и Rdf2	Rdr1	Синтез первичных siРНК при кормлении <i>E. coli</i> ; не жизненно важный	Dcr1 (предположительно)
			Rdr2	Синтез siРНК при кормлении <i>E. coli</i> и микроинъекции трансгенов; жизненно важный	Неизвестно
—	—	—	Rdr3	Синтез siРНК при микроинъекции трансгенов	Неизвестно
—	—	—	Rdr4	Псевдоген (предположительно)	—
Rdn1p	Аккумуляция siРНК, уридилирование РНК (не доказано); жизненно важный	Rdr1; Rdf1, Rdf2	Cid2	Аккумуляция siРНК; жизненно важный	Неизвестно
Rdn2p	Аккумуляция siРНК, являющихся анти-смысловыми для кластеров псевдогенов, уридилирование РНК (не доказано); не жизненно важный	Rdr1	Cid1	Аккумуляция siРНК; не жизненно важный	Неизвестно
Rdf1p	Аккумуляция siРНК; не жизненно важный при вегетативном росте; в отсутствие Rdf1p происходит остановка дифференцировки ядер при конъюгации	Rdr1, Rdn1	—	—	—
Rdf2p	Аккумуляция siРНК, синтез которых стимулируют шпильки в ДНК; не жизненно важный	Rdr1, Rdn1	—	—	—
Dcr2p	Синтез siРНК в вегетативных клетках; жизненно важный	Rdr1	Dcr1	Синтез siРНК в вегетативных клетках; жизненно важный	Rdr1 (предположительно)

точного цикла, и никаких фенотипических аномалий у них не обнаружено [24]. Дальнейший анализ генома *P. tetraurelia* позволил выявить в нем двадцать две Cid1-подобные поли(А)-нуклеотидилтрансферазы, пять из которых, включая саму Cid1, родственны белкам Rdn1 и Rdn2 *T. thermophila* (см. табл. 1). Из них Cid2 также участвует в дцРНК-индуцированном сайленсинге и, по-видимому, является жизненно важным [24].

БЕЛКИ СЕМЕЙСТВА PIWI В ВЕГЕТАТИВНЫХ КЛЕТКАХ ИНФУЗОРИЙ

Наиболее консервативны из основных участников интерференции РНК белки семейства Argonaute/Piwi. Внутри этого семейства можно выделить две паралогичные группы: Piwi-подобные белки, функционирующие на определенных стадиях развития у животных, и Argonaute-подобные (Ago) белки, взаимодействующие у большинства эукариот с различными классами малых РНК. У инфузорий представлены только белки Piwi [7, 28]. Главными доменами белков Piwi являются PAZ и PIWI [29]. PIWI-домен обладает активностью РНКазы [7]. 5'-Конец малых РНК взаимодействует с консервативным сайтом домена PIWI, а домен PAZ связывает их 3'-конец [7]. В результате формирования комплекса с малыми РНК белки PIWI разрезают одну из цепей, и она диссоциирует из комплекса [30].

Белки подсемейства Piwi *T. thermophila* называются Twi (*Tetrahymena* PIWI) [1]. Всего в геноме *T. thermophila* закодировано 12 белков Twi (Twi1–Twi12), и большая часть из них вовлечена в интерференцию РНК в вегетативных клетках [28]. Исключение составляют белки Twi1 и Twi11, участвующие в реорганизации ядер при половом процессе [9]. Гены белков Twi2, Twi8 и Twi12 активно экспрессируются во время вегетативного роста. Было показано, что белки Twi2 и Twi12 локализуются в цитоплазме, а Twi8 — в МАК [28, 31]. Ни один из белков Twi не был обнаружен в транскрипционно неактивном МИК. При этом только Twi12 необходим для вегетативного роста клеток. Еще несколько белков Twi присутствуют в вегетативных клетках в небольших количествах. Как оказалось, каждый из белков Twi в вегетативной фазе жизненного цикла тетрахимены связан со своей популяцией малых РНК (табл. 2).

Интересно, что siРНК размером 18–22 н., которые связывает белок Twi12, образуются не за счет работы Dicer, а отрезаются с 3'-концов зрелых тРНК, о чем говорит наличие внематричной последовательности ССА на их 3'-конце. Основной установленной функцией Twi12 является активация экзорибонуклеазы Xpn2 в МАК, необходимой для процессинга мРНК; для импорта в ядро из цитоплазмы Twi12 должен быть нагружен молекулой малой РНК, и для этого оптимально подходят фрагменты многочислен-

ных тРНК, 3'-концы которых отщепляются РНКазой T2 [32]. В целом же сходная структура siРНК 23–24 н. тетрахимен говорит о том, что специфичность их взаимодействия с теми или иными белками Twi зависит в первую очередь не от модификаций их 5'- и 3'-концов, а от того, с каких последовательностей они были образованы. Многие малые РНК, связанные с белком Twi2, являются антисмысловыми по отношению к псевдогенам, формирующим кластеры в геноме МАК. Нокаут генов *TWI2*, *RDN2* и отчасти гена *TWI8* приводит к потере этих малых РНК [28]. Несмотря на то что геном МАК инфузорий почти не содержит некодирующих последовательностей, там все же есть некоторое количество повторов, к последовательностям которых также обнаружены гомологичные siРНК в вегетативных клетках. Как оказалось, большая часть siРНК, гомологичных высококопийным повторам, тоже связана с белком Twi2. Однако при нокауте гена *TWI8* такие siРНК вообще не накапливаются в клетках, а нокаут генов *TWI2*, *TWI6* и вообще любых компонентов RDRC приводит к снижению их количества [28]. Гомологичные низкокопийным повторам siРНК в основном связаны с белком Twi7, а siРНК длиной 22–24 н. или 33–36 н., гомологичные теломерным повторам, в основном ассоциированы с Twi10. Наконец, siРНК, ассоциированные с белком Twi8, как правило, гомологичны обеим цепям некоторых белок-кодирующих генов, то есть эти siРНК именно выключают экспрессию генов. Интересно, что в числе этих генов оказывается и тандем *TWI2–TWI6*. Действительно, количество мРНК для *TWI2* увеличивается в клонах с нокаутом гена *TWI8* и уменьшается в клонах с гиперэкспрессией гена *TWI8*. Кроме того, было обнаружено семь локусов, не являющихся кодирующими последовательностями, псевдогенами или повторами, для которых было установлено наличие гомологичных siРНК размером 23–24 н. [28]. В отсутствие гомологичных этим локусам siРНК (например, в результате нокаута гена фактора Rdf2, требуемого для их аккумуляции) с этих локусов начинается синтез РНК, что косвенно подтверждает необходимость их сайленсинга. Распределение этих siРНК по смысловой и антисмысловой цепям матрицы асимметрично, и во всех случаях большая часть siРНК комплементарна цепи ДНК, образующей в этих локусах петлеобразную структуру размером 50–100 н. Формирующаяся в ДНК шпилька, видимо, служит затравкой для RDRP, начинающей синтез siРНК. Возможно, такая структура ДНК выступает консервативным маркером, показывающим, что транскрипты с данной матрицы должны быть сайленсированы — например, как вирусоподобные [28].

Белки подсемейства PIWI *P. tetraurelia* называются Ptiwi (*Paramecium tetraurelia* PIWI), всего в ге-

Таблица 2 / Table 2

Малые РНК и белки Piwi в вегетативных клетках *Tetrahymena* [по 28, 31, 32]
Small RNAs and Piwi proteins in vegetative cells of *Tetrahymena* [28, 31, 32]

Характеристики малых РНК	Участки гомологии в геноме МАК	Белки Piwi, с которыми взаимодействуют малые РНК	Локализация белков Piwi	Период экспрессии генов белков Piwi	Белки, важные для аккумуляции малых РНК
23–24 н., U на 3'-конце	Кластеры псевдогенов	Тwi2; реже — Тwi8	Тwi2 — в цитоплазме; Тwi8 — в МАК	Во время вегетативного роста и при конъюгации	Тwi2; Rdn2; Rdr1; частично — Тwi8
23–24 н., без U на 3'-конце	Высококопийные повторы	Тwi2	В цитоплазме	Во время вегетативного роста и при конъюгации, не жизненно важный	Тwi8; Тwi2, Тwi6; Rdr1; Rdn1; Rdf1
23–24 н., имеют метилированную рибозу на 3'-конце, так же как сканРНК	Некоторые кодирующие последовательности	Тwi8	В МАК при вегетативном росте клеток; при конъюгации в старом, затем в новом МАК	Во время вегетативного роста — не жизненно важный; при конъюгации в отсутствие Тwi8p клетки не могут завершить формирование генома нового МАК	Тwi8; RDRC с участием Rdf1
23–24 н., U на 3'-конце; 32–34 н.	Низкокопийные повторы	Тwi7	Неизвестно	Во время вегетативного роста и при конъюгации	Тwi8; Тwi2, Тwi6; компоненты RDRC
23–24 н., U на 3'-конце; 33–36 н.	Теломерные повторы	Тwi10	Неизвестно	Во время вегетативного роста, при конъюгации экспрессия немного возрастает	Тwi8; Тwi2, Тwi6p; компоненты RDRC
23–24 н., несимметричное расположение по цепям матрицы	Локусы, ДНК в которых образует петлеобразные структуры размером 50–100 н.	Тwi2 и Тwi8	Тwi2 — в цитоплазме; Тwi8 — в МАК	Во время вегетативного роста и при конъюгации	Rdf2
18–22 н., внематричные ССА на 3'-конце	Образуются из 3'-концов зрелых тРНК	Тwi12	В цитоплазме	Во время вегетативного роста; жизненно важный	Хrn2 взаимодействует с Тwi12 в МАК

Примечание. МАК — мультигеномный макронуклеус.

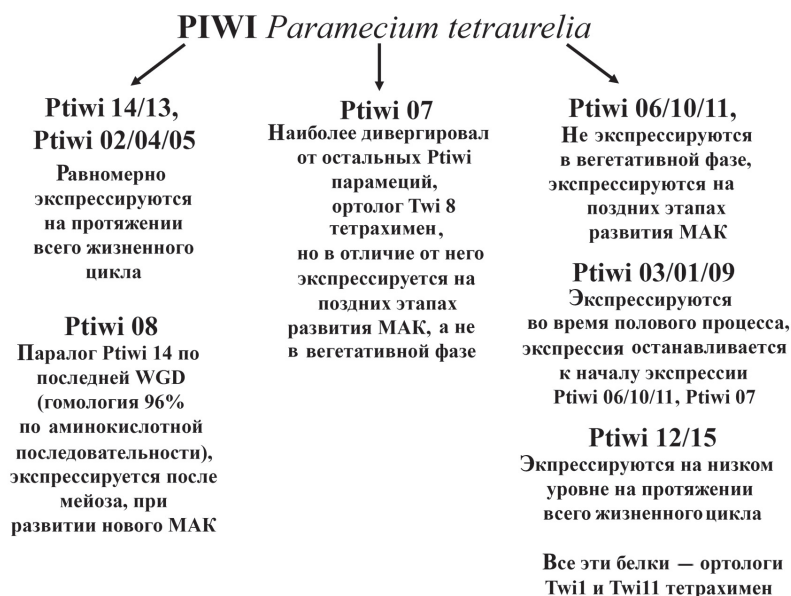


Рис. 4. Характерные особенности трех подсемейств белков Ptiwi *P. tetraurelia*

Fig. 4. Characteristic features of three subfamilies of *P. tetraurelia* Ptiwi proteins

номе этой инфузории найдено 17 генов этих белков, 12 из которых являются парными онологами [7, 24]. Все белки семейства Ptiwi можно разделить на три подсемейства [7] (рис. 4).

К первому подсемейству относятся белки Ptiwi13/14 и Ptiwi02/04/05, гены которых равномерно экспрессируются на протяжении всего жизненного цикла, а также белок Ptiwi08. Белки Ptiwi14 и Ptiwi08 являются паралогами, но ген *PTIW18* активируется только после мейоза, в период развития нового МАК [7] (см. рис. 4). Второе подсемейство образует единственный белок Ptiwi07, который наиболее сильно дивергировал от остальных Ptiwi-белков парамеций. Этот белок представляет собой ортолог Twi8 тетрахимены, однако их функции, по-видимому, различаются. Так ген *TW18* на высоком уровне экспрессируется во время вегетативной фазы, а ген *PTIW107* — на поздних этапах развития МАК [7]. В разные периоды полового процесса экспрессируется также большая часть генов белков третьего подсемейства (см. рис. 4). Гены *PTIW103/01/09* активируются во время мейоза, гены *PTIW106/10/11* экспрессируются одновременно с *PTIW107* в завершающей стадии формирования генома МАК, и только гены *PTIW112* и *PTIW115* конститутивно экспрессируются на низком уровне на протяжении всего жизненного цикла. Внутри последовательности гена *PTIW110* содержатся две IES, одна из которых расположена рядом со старт-кодоном, а вторая — внутри кодирующей последовательности. Именно эта особенность гена *PTIW110* обуславливает его экспрессию на поздних этапах полового процесса — экспрессия становится возможной только после удаления соответствующих IES [33]. Поскольку вну-

три кодирующих последовательностей и регуляторных участков генов *PTIW111*, *PTIW106* и *PTIW107* также содержатся IES, кажется вероятным, что регуляция их экспрессии происходит сходным образом [33].

Лишь для восьми белков Ptiwi экспериментально установлены точные функции. Белки Ptiwi01, Ptiwi09, Ptiwi10 и Ptiwi11 вовлечены в геномное сканирование при половом процессе [6, 7, 33]. Ptiwi13 участвует как в сайленсинге, вызванном микроинъекцией трансгенов, так и в сайленсинге, индуцированном кормлением *E. coli*; Ptiwi14 — только в сайленсинге, обусловленном микроинъекцией трансгенов, а Ptiwi12 и Ptiwi15 задействованы только в сайленсинге, вызванном кормлением [7].

В процессе сайленсинга генов, индуцированного кормлением, у парамеций участвует также белок, названный Pds1 (Paramecium dsRNA-induced RNAi-specific protein) [24], ген которого экспрессируется на протяжении всего жизненного цикла [24]. Для гена *PDS1* не было обнаружено родственных генов в геноме *P. tetraurelia*, а также не выявлено явных гомологов в геномах других инфузорий, но этот ген присутствует у всех видов рода *Paramecium*. Уменьшение количества данного белка, как и в случае Cid1, приводит к потере инфузориями способности к интерференции РНК в ответ на появление экзогенных РНК, но не сказывается на их жизнеспособности. Функция гена остается невыясненной.

В целом скрининг мутантов *P. tetraurelia*, неспособных запускать интерференцию РНК в ответ на дцРНК, продуцируемые пищевыми бактериями, показал, что данный путь не является необходимым и включает

не жизненно важные гены *RDR1*, *CID1* и *PDS1*, а также жизненно важные гены *DCR1* [8], *RDR2* [14] и *CID2*. Кроме того, в этот путь интерференции РНК вовлечены три белка Piwi (Ptiwi12, Ptiwi15 и Ptiwi13) [17]. Было также показано, что *P. tetraurelia* способны синтезировать малые РНК, антисмысловые к рРНК и мРНК самих пищевых бактерий, и эта способность зависит от белка Rdr2 [17]. В трансген-индуцированной интерференции РНК помимо белков Dcr1, Rdr2, Cid2, Ptiwi13 участвуют также Rdr3 и Ptiwi14 [7, 14]. Интересно, что в конечном счете жизненно важные гены вовлечены в оба пути, что может говорить о том, что исходно механизм интерференции РНК у инфузорий был использован для нейтрализации чужеродных генов, которые могли попадать в ядро с вирусами или транспозонами. Способность синтезировать siРНК для нейтрализации РНК, поступающих вместе с пищей, не является необходимой, по крайней мере в лабораторных условиях, так как клоны, мутантные по специфичным для этого пути генам, годами поддерживаются в культуре, питаются одними и теми же «безопасными» бактериями. Тем не менее в геномах у всех видов комплекса *P. aurelia*, а также у *P. multimicronucleatum* и *P. caudatum* представлено как минимум по одной копии генов *RDR1*, *CID1* и *PDS1*, и ключевые факторы запуска интерференции РНК в ответ на экзогенные РНК очень консервативны внутри рода *Paramecium* [24]. Это говорит о том, что данный путь может играть важную роль в выживании парамеций в природных условиях, где под видом пищи или вместе с пищевыми бактериями в клетки инфузорий могут попадать любые микроорганизмы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Инфузории являются золотой жилой для исследования клеточных процессов, основу которых составляет интерференция РНК, играющая колоссальную роль в биологии этих протистов. У инфузорий *Tetrahymena* и *Paramecium* малые РНК лежат в основе формирования сложного ядерного аппарата при половом процессе [6], в результате чего возникают физические и функциональные различия между геномами генеративного и соматического ядер [5]. В вегетативных клетках siРНК регулируют экспрессию собственных генов и не позволяют проявляться чужеродным последовательностям ДНК. У инфузорий до сих пор не обнаружено ни одного вируса, что само по себе является удивительным фактом, учитывая в целом хорошую изученность многих представителей *Ciliophora*. Это косвенно указывает на эффективность противовирусных защитных систем в клетках инфузорий, а интерференция РНК представляет собой древнейший механизм защиты от вирусов. Заманчиво предполагать, что интерференция РНК может быть вовлечена и в другие быстрые ответы инфузорий на внешние стимулы. Например, уже очевидно, что siРНК участвуют в переключении поверх-

ностных антигенов у *P. tetraurelia* [34], а значит, могут обеспечивать регуляцию экспрессии генов при адаптации к изменению условий среды. Известно, что некодирующие РНК бактериального происхождения могут оказывать эффекты на экспрессию генов у *Caenorhabditis elegans* [35]. Транскриптомы *P. tetraurelia*, содержащих в цитоплазме симбиотические бактерии *Caedibacter taeniospiralis*, отличаются от транскриптомов незараженных клеток [36], а данные о появлении в клетках парамеций малых РНК, антисмысловых по отношению к транскриптам пищевых бактерий [17], позволяют допустить, что интерференция РНК может регулировать и судьбу экзогенных транскриптов, и взаимодействие инфузорий с симбионтами.

Исследование выполнено в рамках работ по гранту РФФИ 16-14-10157.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cerutti H, Casas-Mollano JA. On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Curr Genet.* 2006;50(2):81-99. <https://doi.org/10.1007/s00294-006-0078-x>.
2. Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 1998;391(6669):806-811. <https://doi.org/10.1038/35888>.
3. Epigenetics. Ed. by C.D. Allis, M.L. Caparros, T. Jenuwein, D. Reinberg. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015. 984 p.
4. Coyne RS, Chalker DL, Yao MC. Genome downsizing during ciliate development: nuclear division of labor through chromosome restructuring. *Annu Rev Genet.* 1996;30:557-578. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.30.1.557>.
5. Betermier M, Duhaucourt S. Programmed rearrangement in Ciliates: *Paramecium*. *Microbiol Spectr.* 2014;2(6). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0035-2014>.
6. Некрасова И.В., Потехин А.А. Интерференция РНК в формировании соматического генома у инфузорий *Paramecium* и *Tetrahymena* // Экологическая генетика. — 2018. — Т. 16. — № 4. — С. 5–22. [Nekrasova IV, Potekhin AA. RNA interference in formation of the somatic genome of ciliates *Paramecium* and *Tetrahymena*. *Ecological genetics.* 2018;16(4):5-22. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17816/ecogen1645-22>.
7. Bouhouche K, Gout JF, Kapusta A, et al. Functional specialization of Piwi proteins in *Paramecium tetraurelia* from post-transcriptional gene silencing to genome remodelling. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(10):4249-4264. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1283>.
8. Lepère G., Nowacki M., Serrano V. et al. Silencing-associated and meiosis-specific small RNA path-

- ways in *Paramecium tetraurelia*. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(3):903-915. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn1018>
9. Mochizuki K, Fine NA, Fujisawa T, Gorovsky MA. Analysis of a piwi-related gene implicates small RNAs in genome rearrangement in *Tetrahymena*. *Cell.* 2002;110(6):689-699. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00909-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00909-1).
 10. Lee SR, Collins K. Two classes of endogenous small RNAs in *Tetrahymena thermophila*. *Genes Dev.* 2006;20(1):28-33. <https://doi.org/10.1101/gad.1377006>.
 11. Howard-Till RA, Yao MC. Induction of gene silencing by hairpin RNA expression in *Tetrahymena thermophila* reveals a second small RNA pathway. *Mol Cell Biol.* 2006;26(23):8731-8742. <https://doi.org/10.1128/MCB.01430-06>.
 12. Galvani A, Sperling L. Transgene-mediated post-transcriptional gene silencing is inhibited by 3' non-coding sequences in *Paramecium*. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(21):4387-4394. <https://doi.org/10.1093/nar/29.21.4387>.
 13. Ruiz F, Vayssié L, Klotz C, et al. Homology-dependent gene silencing in *Paramecium*. *Mol Biol Cell.* 1998;9(4):931-943. <https://doi.org/10.1091/mbc.9.4.931>.
 14. Marker S, Le Mouél A, Meyer E, Simon M. Distinct RNA-dependent RNA polymerases are required for RNAi triggered by double-stranded RNA versus truncated transgenes in *Paramecium tetraurelia*. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(12):4092-4107. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq131>.
 15. Galvani A, Sperling L. RNA interference by feeding in *Paramecium*. *Trends Genet.* 2002;18(1):11-12. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(01\)02548-3](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(01)02548-3).
 16. Garnier O, Serrano V, Duharcourt S, Meyer E. RNA-mediated programming of developmental genome rearrangements in *Paramecium tetraurelia*. *Mol Cell Biol.* 2004;24(17):7370-7379. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.17.7370-7379.2004>.
 17. Carradec Q, Gotz U, Arnaiz O, et al. Primary and secondary siRNA synthesis triggered by RNAs from food bacteria in the ciliate *Paramecium tetraurelia*. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(3):1818-1833. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1331>.
 18. Gotz U, Marker S, Cheaib M, et al. Two sets of RNAi components are required for heterochromatin formation in trans triggered by truncated transgenes. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(12):5908-5923. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw267>.
 19. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 2001;411(6836):494-498. <https://doi.org/10.1038/35078107>.
 20. Mochizuki K, Gorovsky MA. A Dicer-like protein in *Tetrahymena* has distinct functions in genome rearrangement, chromosome segregation, and meiotic prophase. *Genes Dev.* 2005;19(1):77-89. <https://doi.org/10.1101/gad.1265105>.
 21. Malone CD, Anderson AM, Motl JA, et al. Germ line transcripts are processed by a Dicer-like protein that is essential for developmentally programmed genome rearrangements of *Tetrahymena thermophila*. *Mol Cell Biol.* 2005;25(20):9151-9164. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.20.9151-9164.2005>.
 22. Aury JM, Jaillon O, Duret L, et al. Global trends of whole-genome duplications revealed by the ciliate *Paramecium tetraurelia*. *Nature.* 2006;444(7116):171-178. <https://doi.org/10.1038/nature05230>.
 23. Sandoval PY, Swart EC, Arambasic M, Nowacki M. Functional diversification of Dicer-like proteins and small RNAs required for genome sculpting. *Dev Cell.* 2014;28(2):174-188. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.12.010>.
 24. Marker S, Carradec Q, Tanty V, et al. A forward genetic screen reveals essential and non-essential RNAi factors in *Paramecium tetraurelia*. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(11):7268-7280. <https://doi.org/10.1093/nar/gku223>.
 25. Baulcombe DC. Molecular biology. Amplified silencing. *Science.* 2007;315(5809):199-200. <https://doi.org/10.1126/science.1138030>.
 26. Lee SR, Collins K. Physical and functional coupling of RNA-dependent RNA polymerase and Dicer in the biogenesis of endogenous siRNAs. *Nat Struct Mol Biol.* 2007;14(7):604-10. <https://doi.org/10.1038/nsmb1262>.
 27. Lee SR, Talsky KB, Collins K. A single RNA-dependent RNA polymerase assembles with mutually exclusive nucleotidyl transferase subunits to direct different pathways of small RNA biogenesis. *RNA.* 2009;15(7):1363-1374. <https://doi.org/10.1261/rna.1630309>.
 28. Couvillion MT, Lee SR, Hogstad B, et al. Sequence, biogenesis, and function of diverse small RNA classes bound to the Piwi family proteins of *Tetrahymena thermophila*. *Genes Dev.* 2009;23(17):2016-2032. <https://doi.org/10.1101/gad.1821209>.
 29. Cerutti L, Mian N, Bateman A. Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Biochem Sci.* 2000;25(10):481-482. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(00\)01641-8](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(00)01641-8).
 30. Matranga C, Tomari Y, Shin C, et al. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell.* 2005;123(4):607-620. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.044>.
 31. Farley BM, Collins K. Transgenerational function of *Tetrahymena* Piwi protein Twi8p at distinctive noncod-

- ing RNA loci. *RNA*. 2017;23(4):530-545. <https://doi.org/10.1261/rna.060012.116>.
32. Couvillion MT, Bounova G, Purdom E, et al. A *Tetrahymena* Piwi bound to mature tRNA 3' fragments activates the exonuclease Xrn2 for RNA processing in the nucleus. *Mol Cell*. 2012;48(4):509-520. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.010>.
33. Furrer DI, Swart EC, Kraft MF, et al. Two sets of Piwi proteins are involved in distinct sRNA pathways leading to elimination of germline-specific DNA. *Cell Rep*. 2017;20(2):505-20. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.050>.
34. Baranasic D, Oppermann T, Cheaib M, et al. Genomic characterization of variable surface antigens reveals a telomere position effect as a prerequisite for RNA interference-mediated silencing in *Paramecium tetraurelia*. *MBio*. 2014;5(6):e01328. <https://doi.org/10.1128/mBio.01328-14>.
35. Liu H, Wang X, Wang HD, et al. *Escherichia coli* noncoding RNAs can affect gene expression and physiology of *Caenorhabditis elegans*. *Nat Commun*. 2012;3:1073. <https://doi.org/10.1038/ncomms2071>.
36. Grosser K, Ramasamy P, Amirabad AD, et al. More than the "killer trait": infection with the bacterial endosymbiont *Caedibacter Taeniospiralis* causes transcriptomic modulation in *Paramecium* host. *Genome Biol Evol*. 2018;10(2):646-656. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy024>.

✿ Информация об авторах

Ирина Владимировна Некрасова — канд. биол. наук, доцент кафедры микробиологии биологического факультета. ФГБУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург. E-mail: ne-irina@yandex.ru.

Алексей Анатольевич Потехин — канд. биол. наук, профессор кафедры микробиологии биологического факультета. ФГБУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург. E-mail: alexey.potekhin@spbu.ru.

✿ Information about the authors

Irina V. Nekrasova – PhD, Associate Professor, Faculty of Biology. Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia. E-mail: ne-irina@yandex.ru.

Alexey A. Potekhin – PhD, Full-Professor, Faculty of Biology. Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia. E-mail: alexey.potekhin@spbu.ru.