

© А. Л. Юдин

Институт цитологии РАН,
Санкт-Петербург**ГЕНЕТИКА ИЛИ ЭПИГЕНЕТИКА?
ЧАСТНЫЙ СЛУЧАЙ ИЗ ЖИЗНИ ИНФУЗОРИЙ**

✿ Описывается наследование трех типов спаривания у инфузории *Dileptus anser*. При агамном (вегетативном) размножении клоны сохраняют свой тип спаривания неизменным. В половых поколениях (при скрещиваниях) признак ведет себя как контролируемый одним локусом с тремя аллелями в нем, обнаруживающими серийное доминирование, т. е. вроде бы находится под прямым генным контролем. Однако обработка актиномицином D инфузорий из клонов, стабильно проявляющих тот или иной тип спаривания, дестабилизирует их: они начинают последовательно проявлять все три типа спаривания. Это заставляет предполагать, что на самом деле тип спаривания клона — результат стабильной эпигенетической дифференцировки сложного, мультипотенциального локуса.

✿ **Ключевые слова:** инфузории *Dileptus anser*; типы спаривания; наследование; эпигенетический контроль; актиномицин D.

Термин «эпигенетика», в его современном понимании, связан с именами не только эмбриолога Уоддингтона, но и одного из крупнейших генетиков-протистологов, Дэвида Нэнни (Gottschling, 2004; Haig, 2004). В своей статье 1958 года “Epigenetic control systems” Нэнни (Nanney, 1958) перечислил характерные особенности эпигенетических систем и связанные с ними проблемы.

В частности, Нэнни подчеркивает, что эпигенетические системы обнаруживают широкий диапазон стабильности. Он пишет (с. 713–714), что «клетки с одинаковым генотипом могут не только иметь разные фенотипы, но эти различия в экспрессируемых потенциях могут сохраняться неопределенно долго в ходе клеточных делений по существу в одних и тех же условиях. Эти наблюдения создают реальную проблему. Одно из операциональных определений «наследственных различий» включает неопределенно долгое воспроизведение клеточных различий при росте в одних и тех же условиях. Тем не менее известны примеры, когда клеточные различия могут поддерживаться в отсутствие выявляемых генетических или средовых различий. Следовательно, наблюдение неопределенно долгого сохранения различий не позволяет отличить устойчивый гомеостаз, обусловленный сохранением ДНК (генетический гомеостаз) от устойчивого гомеостаза, обусловленного эпигенетической регуляцией (эпигенетический гомеостаз)».

Более того, указывает Нэнни, «Если такие системы локализованы таким образом [на самих хромосомах — А. Ю.] и, особенно, если они демонстрируют значительную стабильность, они вели бы себя в гибридологическом анализе строго сравнимым с генетическими системами образом и были бы неотличимы от них только на этой основе» (с. 714).

В своей работе с простейшими мы столкнулись как раз с такой ситуацией. В настоящем сообщении это будет кратко проиллюстрировано экспериментальным материалом, опубликованным автором и его сотрудниками.

Мы уже довольно давно работаем с низшей инфузорией *Dileptus anser* (= *Dileptus margaritifer*) — объектом, новым для генетики инфузорий и интересным главным образом в плане сравнительной генетики этих простейших, если учесть, что инфузории, как и простейшие вообще, чрезвычайно разнообразны во всех своих проявлениях и что изучение самого этого разнообразия представляет самостоятельный интерес. По этой же причине для исследования были выбраны классические для генетики (и для эпигенетики!) инфузорий признаки: так называемые серотипы и типы спаривания, их наследование и детерминация. Изучение типов спаривания у дилептусов интересно еще и потому, что дилептусы относятся к тем немногим инфузориям, которые выделяют в окружающую среду специфические сигнальные молекулы — феромоны спаривания (гамоны), запускающие половой процесс, и тип спаривания организма определяется тем, какие феромоны он экскретирует и какие рецепторы феромонов находятся на его клеточной поверхности (Юдин и др. 1990).

Типы спаривания (ТС) обнаружены у десятков видов, представляющих все три класса инфузорий (обзор: Miyake, 1996). Системы ТС, их генетический контроль и способы их наследования (там, где они исследованы) весьма разнообразны. Говоря коротко, есть системы, где ТС непосредственно и однозначно определяется генами и их аллелями. На противоположном полюсе

Поступила в редакцию 15.03.2010.
Принята к публикации 21.09.2010.

находятся системы, где сложный, мультипотенциальный локус ТС претерпевает эпигенетическую дифференцировку, в результате которой фенотипически реализуется лишь одна из нескольких наследственных генотипических потенций (обзоры: Афонькин, 1991; Сигел, 1970; Bleyma, 1996; Miyake, 1996; Sonneborn, 1977). Конкретные механизмы эпигенетической дифференцировки по ТС у инфузорий остаются все еще неизвестными. Даже у знаменитой *Tetrahymena thermophila*, где типы спаривания изучаются уже более 50 лет, механизмы, контролирующие их детерминацию и наследование, остаются пока не известными (Orias, 1981).

У *Dileptus anser* до сих пор обнаружены лишь три ТС — ТС I, ТС II и ТС III. Большинство выловленных в природе и принесенных в лабораторию особей образуют клоны, которые, по результатам скрещиваний с тестерными клонами, относятся к тому или другому из трех ТС, обнаруженных у этого вида. И этот тип спаривания остается неизменным при повторных тестированиях данного клона на протяжении многих месяцев и даже лет лабораторного культивирования. Другими словами, все три ТС стабильно наследуются в ходе вегетативного (агамного) размножения при культивировании в лаборатории.

Особь, различающиеся по ТС, способны конъюгировать (половой процесс). После конъюгации два конъюганта расходятся, начинают питаться и размножаться делением надвое (агамное, или вегетативное размножение) и образуют так называемые эконъюгантные клоны, по два от каждой пары конъюгантов (так называемый синклон). Некоторое время дилептусы эконъюгантного клона не могут спариваться с клетками комплементарных ТС и вступать в следующую конъюгацию — как и у многих других инфузорий, у дилептусов имеет место так называемый период незрелости. Лишь после многих (более 100) клеточных делений эконъюганты созревают и могут спариваться со зрелыми клетками других ТС. Только теперь можно определить их собственный ТС в соответствии с тем, какие ТС окажутся комплементарными их ТС.

Исследовали, как сам тип спаривания наследуется при скрещиваниях, в половых поколениях. Оказалось, что когда два случайно выбранных клона *Dileptus* скрещивают друг с другом, наблюдается обычное менделевское поведение ТС: признак наследуется в половых поколениях как монофакториальный, оба эконъюгантных клона, происходящие от пары конъюгантов, имеют одинаковый ТС (так называемое синклональное наследование). Следовательно, судя по всем этим критериям, изучаемый признак находится под прямым генным контролем, т. е. имеет место однозначное соответствие между генотипом и фенотипом. Полученные в этих опытах результаты приводятся в работе (Юдин, Успенская, 2006). Был получен не очень большой материал — технически это оказалось довольно сложным делом. Тем не менее, результаты таких скрещиваний позволяли считать, что

три ТС контролируются одним локусом (*mat*) с тремя аллелями, демонстрирующими серийное доминирование (Юдин, Афонькин, 1987; Юдин, Успенская, 2006). Соответственно, дилептусы с генотипом *mat*¹/*mat*² или *mat*¹/*mat*³ имеют ТС I, с генотипом *mat*²/*mat*² или *mat*²/*mat*³ — ТС II, а с генотипом *mat*³/*mat*³ — ТС III. Этот результат не был сколько-нибудь необычным: в точности такая же система генетической детерминации и наследования ТС была, например, описана ранее у *Tetrahymena pigmentosa* (Orias, 1963; Simon, 1980).

Однако в действительности ситуация оказалась сложнее. Когда исходные, стабильные по ТС лабораторные культуры дилептусов были выдержаны 3 сут в среде с антибиотиком актиномицином D (15 мкг/мл), мы неожиданно обнаружили, что после такой обработки дилептусы стали нестабильными по этому признаку. Например, клон № 153 (ТС III), субклонированный на ряд субклонов (табл. 1), при последовательных тестированиях проявлял то свой старый, исходный ТС III, то ТС II, то, наконец, ТС I. Сходно вели себя после обработки актиномицином клоны, представлявшие два других ТС (Юдин, Успенская, 2009-а). Никаких явных закономерностей смены ТС у этих клонов уловить не удалось. Можно лишь отметить, что (1) разные субклоны дестабилизированного клона вели себя в этом отношении не синхронно и неодинаково, но (2) по совершенно непонятным причинам каждое изменение ТС охватывало все клетки данного субклона — селфинг никогда не наблюдали, (3) изменению ТС часто предшествовало более или менее длительное состояние незрелости или частичной зрелости. Важно подчеркнуть, что и временное состояние незрелости (или частичной зрелости), и состояние временной экспрессии того или иного ТС, и, наконец, само состояние нестабильности у дестабилизированных клонов наследовались на протяжении десятков вегетативных поколений. Мы никогда не наблюдали реверсию к стабильному состоянию, стабилизацию однажды дестабилизированного клона, и остается непонятным, почему выделенные из природы зрелые клоны дилептусов всегда были стабильными по ТС.

Таким образом, оказывается, что в генотипе клетки, стабильно воспроизводящей тот или иной тип спаривания, имеются генетические потенции и для двух других ТС. При некоторых условиях эти потенции могут проявиться. Это позволило нам предложить гипотезу о сложной, комплексной природе локуса ТС и его эпигенетической дифференцировке в ходе созревания эконъюгантных клонов *D. anser* (Yudin, Uspenskaya, 2007). Мы предполагаем, что локус *mat* у *D. anser* является сложным, комплексным локусом, т.е. содержит генетические потенции для всех трех ТС. В созревающем эконъюгантном клоне этот локус проходит в макронуклеусе эпигенетическую дифференцировку, в результате которой экспрессируется лишь одна из трех генетических потенций, кодируемых этим локусом (по принципу «вза-

Таблица 1

Изменения типа спаривания клона № 153 (ТС III) после воздействия актиномицином D (15 мкг/мл, 3 сут) (Юдин, Успенская, 2009а)

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?); полужирным шрифтом выделены случаи проявления ТС, не характерного для исходного клона № 153

имного исключения» — Nanney, 1958), и формируется та или другая эпиплель, определяющая соответствующий ТС.

Очевидно, что эта ситуация весьма напоминает то, что имеет место у *Tetrahymena thermophila* (Sonnenborn, 1977). У *D. anser*, однако, экспрессию только одного определенного ТС следует считать результатом функциональной инактивации двух других потенциалов, которые, тем не менее, сохраняются в скрытом, неактивном состоянии! У тетрахимены же, согласно модели, предложенной Ориасом (Orias, 1981), предполагается физическая элиминация всех других потенциалов сложного локуса кроме экспрессируемой.

Для инфузорий характерен ядерный дуализм, т. е. наличие в одной клетке ядер двух типов: генеративного (микронуклеуса) и соматического (макронуклеуса). Очевидно, что все, что говорилось выше о фенотипических изменениях типов спаривания у дестабилизированных клонов дилептусов, должно быть связано с процессами, происходящими в соматическом ядре — макронуклеу-

се, ибо именно он определяет весь фенотип клетки. А за менделирование признака в половых поколениях должно отвечать генеративное ядро — микронуклеус. Но для этого и в нем, по всей вероятности, должен находиться сложный, мультипотенциальный локус *mat* — иначе откуда бы он взялся в макронуклеусе. Очевидно также, что и в микронуклеусе должна происходить эпигенетическая дифференцировка этого сложного локуса. Более того, следует предположить, что то или иное состояние дифференцировки сложного локуса реализуется только в *cis*-конфигурации, прочно связано с соответствующей хромосомой и таким образом проходит через мейоз. Иначе мы не наблюдали бы менделевского расщепления в потомстве от скрещиваний (сравни, например: Grewal, Klar, 1996).

Очевидно, наконец, что для того, чтобы можно было наблюдать менделевское поведение признака, должно иметь место некое «согласование» эпигенетических процессов в микро- и макронуклеусе. Следует принять, что дифференцировка микронуклеуса (возникновение той

или иной эпипаллели изучаемого локуса) каким-то образом предопределяет направление дифференцировки макронуклеуса. Лишь при таком условии обеспечивалось бы однозначное соответствие между эпипаллелями в микро- и в макронуклеусе. Что касается механизмов межъядерных взаимодействий у инфузорий, то в самое последнее время накапливаются данные об информационной роли в них малых РНК. Правда, эти данные пока что главным образом касаются межъядерных взаимодействий, контролирующих очень сложные и очень точные перестройки генома зародышевой линии, происходящие в развивающемся в результате конъюгации новом макронуклеусе. Наиболее широко обсуждается так называемая модель сканирующих РНК (обзоры: Duharcourt et al., 2009; Meyer, Chalker, 2007; Nowacki, Landweber, 2009).

К сожалению, гипотеза об эпигенетической детерминации ТС у *Dileptus anser* предлагается на фоне отсутствия сведений о конкретных цитогенетических процессах при конъюгации у дилептусов. Неизвестно, соответствуют ли они «стандартной» для инфузорий схеме (образование единственного синкариона и пр.), как возникают многочисленные макронуклеусы (называемые у этого вида «фрагментированным» МА), эквивалентны ли эти множественные МА генетически и насколько сбалансированно они репродуцируются, и т. д., и т. п. Равным образом вряд ли можно сейчас говорить о конкретных молекулярных механизмах, лежащих в основе наблюдаемых явлений.

Что касается дестабилизирующего действия на дилептусов антибиотика актиномицина D, то мы хотели бы обратить внимание на следующую аналогию. В свое время мы работали с совершенно другими простейшими — с одноклеточными амёбами типа *Amoeba proteus* (Юдин 1982). У этих простейших нет полового процесса, и мы для генетических исследований применяли микрохирургическую трансплантацию клеточных ядер. Была собрана коллекция лабораторных и выделенных из природы клонов. Многие из них отличались друг от друга по тем или иным морфологическим или физиологическим признакам. Различия эти сохранялись на протяжении многих лет культивирования клонов. Но оказалось, что эти различия, по всей видимости, не генетические, а эпигенетические.

Основной эксперимент, свидетельствующий в пользу этого предположения, выглядел следующим образом. Интерфазное ядро амёбы клона X подсаживали амёбе клона Y и через короткое время (до деления ядер) этот искусственно полученный гетерокарион разрезали на две одноклеточные половинки. От каждой из них выращивали клон, и оба клона тестировали по маркерному признаку многократно, с небольшими интервалами. Оказалось, что фенотип обоих таких клонов изменился. Если у исходных клонов X и Y значения маркерного признака при повторных испытаниях варьировали в определенных, характерных для каждого клона пределах, то каждый из потомков клетки-гетерокариона в одних опытах был похож

на «родителя» X, а в других — на «родителя» Y, то есть был нестабильным по маркерному признаку. Сама эта нестабильность была наследственной и при трансплантации передавалась как с ядром, так и с цитоплазмой.

Кроме того оказалось, что такую нестабильность можно индуцировать у исходных амёб X или Y некоторыми воздействиями на них, в частности обрабатывая их актиномицином D. Так, обработка раствором 100 мкг/мл в течение 6 ч при незначительном токсическом эффекте вызывала дестабилизацию амёб сразу по двум случайно выбранным маркерным признакам, причем с очень высокой частотой (Калинина, 1968). Отметим, что при меньших концентрациях актиномицина (5–20 мкг/мл, 3–40-часовое воздействие) не обнаружили никаких изменений в устойчивости амёб к стрептомицину (Hawkins, 1968). Дестабилизирующее действие актиномицина D (1000 мкг/мл, 2 ч) обнаружили и мы (Юдин, 1979).

Таким образом, у двух совершенно разных видов простейших, амёб и инфузорий, актиномицин индуцирует феноменологически сходную наследуемую нестабильность признаков и, с определенной точки зрения, может рассматриваться как «эпимутаген» (Юдин, Успенская, 2009-б). О механизмах «эпимутагенного» действия этого вещества применительно к нашим моделям мы, конечно же, ничего не знаем и можем лишь строить предположения о роли малых РНК, структуры хроматина и т. д.

Итак, приведенные примеры показывают, как нам кажется, насколько стабильными в ряду поколений могут быть эпигенетически детерминированные признаки и как непросто в таких случаях отличить эпигенетические системы от генетических. Даже поведение таких признаков при скрещиваниях может имитировать поведение признаков, детерминированных генетически. Остается открытым вопрос о том, насколько часты такие ситуации и какими способами их можно распознавать.

Литература

1. Афонькин С. Ю., 1991. Межклеточное самораспознавание у простейших // Итоги науки и техники. ВИНТИ, сер. Зоология беспозвоночных, т. 9. М.: ВИНТИ, 160 с.
2. Калинина Л. В., 1968. Наследуемые изменения у амёб, вызываемые действием актиномицина D // Цитология. Т. 10. № 12. С. 1589–1597.
3. Сигел Р. У., 1970. Генетическая обусловленность типов спаривания у инфузорий // Онтогенез. Т. 1. № 2. С. 157–165.
4. Юдин А. Л., 1979. Механизмы дестабилизации наследственных признаков у амёб. II. Наследуемые изменения, индуцированные некоторыми антибиотиками // Acta protozool. Vol. 18. № 4. С. 571–579.
5. Юдин А. Л., 1982. Ядерно-цитоплазматические взаимоотношения и клеточная наследственность у амёб. Л.: Наука, 200 с.
6. Юдин А. Л., Афонькин С. Ю., 1987. Генетическая детерминация и наследование типов спаривания у инфузории

- Dileptus anser* (Gymnostomatida, Holotricha) // Современные проблемы протозоологии. Л.: Наука. 32.
7. Юдин А. Л., Афонькин С. Ю., Парфенова Е. В., 1990. Феромоны спаривания у инфузории *Dileptus anser* // Цитология. Т. 32. № 2. С. 106–115.
 8. Юдин А. Л., Успенская З. И., 2006. Типы спаривания у инфузории *Dileptus anser*. Наследование и генетическая детерминация // Цитология. Т. 48. № 4. С. 364–374.
 9. Юдин А. Л., Успенская З. И., 2009-а. Индуцированная актиномицином D смена типа спаривания у инфузории *Dileptus anser* // Цитология. Т. 51. № 1. С. 84–88.
 10. Юдин А. Л., Успенская З. И., 2009-б. Актиномицин D индуцирует у двух очень разных протистов сходную наследуемую нестабильность признаков // Тр. Съезда генетиков и селекционеров, посвященного 200-летию со дня рождения Чарльза Дарвина, и V съезда ВОГиС (Москва, 21–28 июня 2009 г.). Ч. I, С. 58.
 11. Bleyman L. K., 1996. Ciliate genetics // Ciliates: Cells as organisms. / Eds. R. Hausmann and P. C. Bradbury. Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer Verlag. P. 291–324.
 12. Duhaucourt S., de Lepère G., Meyer E., 2009. Developmental genome rearrangements in ciliates: a natural genomic subtraction mediated by non-coding transcripts // Trends in Genetics. Vol. 25. N8. С. 344–350.
 13. Gottschling D. E., 2004. Summary: Epigenetics — from Phenomenon to Field // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. Vol. 69. С. 507–519.
 14. Grewal S. I. S., Klar I. J. S., 1996. Chromosomal inheritance of epigenetic states in fission yeast during mitosis and meiosis // Cell. Vol. 86. P. 95–101.
 15. Haig D., 2004. The (dual) origin of epigenetics // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. Vol. 69. P. 67–70.
 16. Hawkins S. E., 1968. Effect of actinomycin D on the assimilation of a cytoplasmic determinant in amoebae // Nature. Vol. 220. P. 923–924.
 17. Meyer E., Chalker D. L., 2007. Epigenetics of Ciliates // Epigenetics / Eds. C. D. Allis et al. CSHL Press. P. 127–150.
 18. Miyake A., 1996. Fertilization and Sexuality in Ciliates // Ciliates: Cells as Organisms / Eds. R. Hausmann and P. C. Bradbury. Stuttgart; Jena; New York: Gustav Fischer Verlag. P. 243–290.
 19. Nanney D. L., 1958. Epigenetic control systems // Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. Vol. 44, N7. P. 712–717.
 20. Nowacki M., Landweber L. F., 2009. Epigenetic inheritance in ciliates // Curr. Opin. Microbiol. Vol. 12. P. 638–643.
 21. Orias E., 1963. Mating type determination in variety 8, *Tetrahymena pyriformis* // Genetics. Vol. 48. P. 1509–1518.
 22. Orias E., 1981. Probable somatic DNA rearrangements in mating type determination in *Tetrahymena thermophila*: A review and a model // Develop. Genetics. Vol. 2. P. 185–202.
 23. Simon E. M., 1980. Mating-type inheritance and maturity times in crosses between subspecies of *Tetrahymena pigmentosa* // Genetics. Vol. 94. P. 93–113.
 24. Sonneborn T. M., 1977. Genetics of cellular differentiation: stable nuclear differentiation in eukaryotic unicells // Annu. Rev. Genet. Vol. 11. P. 349–367.
 25. Yudin A. L., Uspenskaya Z. I., 2007. Nuclear differentiation for mating types in the ciliate *Dileptus anser*: A hypothesis // Cell Biol. Internat. Vol. 31. P. 428–432.

GENETICS OR EPIGENETICS? A PECULIAR CASE FROM THE CILIATE LIFE

Yudin A. L.

✿ **SUMMARY:** Inheritance of three mating types (MTs) in the ciliate *Dileptus anser* is described. When reproduced vegetatively, clones of dilepti retain their mating type invariably. In sexual generations (at crosses) the character behaves as controlled by one locus with three alleles in it, manifesting serial dominance. In other words, the character seems to be under the direct genic control. However, after treatment with Actinomycin D, ciliates from clones which stably express this or that MT, become destabilized and start to express in turn all three MTs. It suggests that actually MT of such a clone results from stable epigenetic differentiation of a complex, multipotential locus.

✿ **KEY WORDS:** ciliates *Dileptus anser*; mating types; inheritance; epigenetic control; actinomycin D.

✿ Информация об авторах

Юдин Александр Львович — главный научный сотрудник, профессор, доктор биологических наук.
Учреждение Российской академии наук Институт цитологии РАН,
194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4.
E-mail: alyudin@mail.ru.

Yudin Aleksandr Lvovich — professor, doctor of biological science.
Institute of a cytology of the Russian Academy of Science,
St.-Petersburg.
E-mail: alyudin@mail.ru.