

На правах рукописи

**ПИМЕНОВ**

**Александр Юрьевич**

**РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ КЛАССА II  
У ИНFUЗОРИИ *STYLONYCHIA LEMNAE***

**03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология**

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Санкт-Петербург  
2007**

Работа выполнена в Институте цитологии РАН, Санкт-Петербург

**Научные руководители:**

доктор биологических наук  
кандидат биологических наук

**Скарлато Сергей Орестович**  
**Сковородкин Илья Николаевич**

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук  
доктор биологических наук, профессор

**Снигиревская Екатерина Сергеевна**  
**Хованских Александр Егорович**

**Ведущая организация:**

Санкт-Петербургский  
государственный университет,  
Биолого-почвенный факультет

Защита состоится 30 мая 2007 г. в 15 часов на заседании Диссертационного совета Д.002.230.01 при Институте цитологии РАН по адресу: 194064, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., дом 4., факс: (812) 297-0341, электронная почта: cellbio@mail.cytspb.rssi.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН

Автореферат разослан 17 апреля 2007 года

Ученый секретарь диссертационного совета  
кандидат биологических наук

Каминская Е.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Инфузории (тип Ciliophora) являются одними из наиболее высоко организованных представителей царства Protista (Догель, 1981; Brusca, Brusca, 2002). Многие аспекты их строения, локомоции, размножения и организации ядерного аппарата на протяжении многих лет привлекают внимание специалистов из разных областей науки. Большой интерес для исследований в области клеточной и молекулярной биологии представляет группа брюхожесничных инфузорий, которые ввиду особенностей организации их генома являются удобными модельными объектами для экспериментов.

В настоящей работе мы придерживаемся классификации, согласно которой тип Ciliophora включает класс Spirotrichea, содержащий отряды Spirotrichida (роды *Stylonychia* и *Oxytricha* (*Sterkiella*)) и Hypotrichida (род *Euplotes*), класс Oligohymenophorea (род *Tetrahymena*) и класс Nassophorea (род *Paramecium*) (Lynn, Small, 1985). При этом представителей отрядов Spirotrichida и Hypotrichida исторически принято объединять в группу брюхожесничных инфузорий. Поэтому, говоря о родах *Stylonychia*, *Oxytricha* (*Sterkiella*) и *Euplotes*, мы будем использовать в равной степени термины брюхожесничные инфузории и инфузории-спиротрихи.

Ядерный гетероморфизм, характерный для всех представителей типа Ciliophora, у инфузорий-спиротрих выражен наиболее ярко (Райков, 1978; Осипов, 1981; Klobutcher, Prescott, 1986). В транскрипционно активном макронуклеусе этих протистов содержатся короткие линейные молекулы – минихромосомы, каждая из которых несет, как правило, один единственный ген. Таким образом, каждый макронуклеарный ген представляет собой автономную репликационную и транскрипционную единицу (Осипов, 1981; Klobutcher, Prescott, 1986) (рис. 1).

Такая организация генетического материала наиболее удобна для изучения процессов реализации генетической информации, в том числе и регуляции инициации транскрипции (Пименов и др., 2006). Действительно, все регуляторные элементы молекулы ДНК, необходимые для корректной инициации транскрипции, сосредоточены в сравнительно короткой лидерной фланкирующей области минихромосомы, что значительно сужает диапазон исследования.



**Рис. 1.** Обобщенная схема строения минихромосомы *Stylonychia lemnae* (по: Пименов и др., 2006). В рамках справа и слева указаны нуклеотидные последовательности теломера.

Изучение регуляции инициации транскрипции генов класса II у эукариотических организмов привело к созданию классической схемы строения промоторной области (Lee, Young, 2000). Так, для генов класса II большинства эукариот постулировано присутствие таких регуляторных нуклеотидных последовательностей, как СААТ-бокс и ТАТА-бокс в положениях 100-150 и 25-30 п.н. левее точки начала транскрипции, соответственно, и инициатора транскрипции - нуклеотидной последовательности, окружающей точку начала транскрипции. Одновременно с этим изучение генов класса II у представителей типа Ciliophora привело исследователей к выводу об отсутствии в этих генах описанных у других эукариот классических элементов регуляции (Ghosh et al., 1994). Причина этого заключается в том, что основным методом большинства исследователей был

теоретический анализ нуклеотидных последовательностей различных генов с целью поиска уже известных регуляторных нуклеотидных последовательностей в их классических положениях (так называемый сравнительно-молекулярный метод) (Helftenbein, 1985; Conzelmann, Helftenbein, 1987; Helftenbein, Muller, 1988; Helftenbein et al., 1989; Steinbruck, 1990; Пименов и др., 2006). При этом экспериментальная проверка соответствующих областей минихромосомы отсутствовала, что ставит под сомнение все выводы, сделанные исследователями.

Появившееся в литературе большое количество противоречивых данных относительно состава основного промотора генов класса II представителей типа Ciliophora дало толчок к разработке экспериментальных подходов в изучении рассматриваемого вопроса (Пименов и др., 2006). Так, научно-исследовательской группой, в которую входит автор настоящей диссертации, с использованием инфузории-спиротрихи *Stylonychia lemnae* в качестве модельного объекта был разработан метод котрансфекции инфузорий мутантными векторами, содержащими делеции и нуклеотидные замены в интересующих участках 5'-некодирующей области гена, что позволяет с высокой точностью локализовать присутствующие регуляторные последовательности ДНК (Skovorodkin et al., 1999). С использованием этого метода был частично проанализирован промотор гена  $\alpha 1$ -тубулина *S. lemnae* (Pimenov et al., 2002; Zassoukhina et al., 2002; Райхель, 2003; Пименов и др., 2006; Skovorodkin, Pimenov et al., 2007).

Однако, несмотря на уверенное внедрение экспериментальных подходов в изучение строения промоторной области генов класса II инфузорий и значительные успехи в разработке методов котрансфекции инфузорий мутантными векторами, до настоящего времени еще ни один промотор генов инфузорий не был проанализирован полностью. До сих пор не получена полная схема элементов, осуществляющих регуляцию транскрипции у ресничных простейших, не найдены возможные энхансеры, репрессоры и индукторы, описанные для многих генов эукариот.

**Цель настоящей работы** – изучить структуру компонентов регуляторной области генов класса II у инфузории *Stylonychia lemnae*, контролирующих инициацию транскрипции.

**Задачи исследования** состояли в следующем.

1. Определить точки начала транскрипции в ряде генов инфузории *S. lemnae*.
2. На основе минихромосом, несущих гены  $\alpha 1$ - и  $\alpha 2$ -тубулина *S. lemnae*, создать необходимые мутантные конструкции, содержащие делеции и нуклеотидные замены в 5'-некодирующей области генов.
3. Сравнить эффективность транскрипции мутантных конструкций и нативных минихромосом, несущих исследуемые гены *in vivo*.
4. Определить и описать нуклеотидные последовательности ДНК в 5'-некодирующей области гена  $\alpha 1$ -тубулина *S. lemnae*, необходимые для регуляции транскрипции.
5. Сравнить эффективность транскрипции мутантных конструкций и нативных минихромосом, несущих исследуемые гены  $\alpha 1$ - и  $\alpha 2$ -тубулина *S. lemnae* в нормальных условиях и при индукции синтеза тубулина под воздействием лектина конканавалина А.
6. Определить местоположение регуляторного элемента, контролирующего индукцию, в гене  $\alpha 2$ -тубулина.
7. Сопоставить полученные экспериментальные данные о строении основного промотора генов  $\alpha 1$ - и  $\alpha 2$ -тубулина *S. lemnae* с данными по другим генам инфузорий-спиротрих.

**Основные положения, выносимые на защиту.**

1. У инфузории *S. lemnae* 5'-некодирующая область минихромосомы, несущей ген  $\alpha 1$ -тубулина, содержит следующие нуклеотидные последовательности, необходимые для корректной инициации транскрипции:
  - (а) инициатор, имеющий нуклеотидный состав ТАТАА, где второй нуклеотид А – точка начала транскрипции;
  - (б) классический ТАТА-бокс, представленный нуклеотидной последовательностью ТАААТА и расположенный между позициями –23 и –28 п.н. левее точки начала транскрипции;
  - (в) СААТ-бокс, имеющий нуклеотидный состав САТАТ и расположенный между позициями –45 и –49 п.н. левее точки начала транскрипции;
  - (г) энхансер – GC-бокс, имеющий нуклеотидный состав GATCCC и расположенный между позициями –75 и –82 п.н. левее точки начала транскрипции;
  - (д) репрессор, расположенный между позициями –155 и –114 п.н. левее точки начала транскрипции.
2. Способность гена  $\alpha 2$ -тубулина инфузории *S. lemnae* к индукции лектином конканавалином А регулируется индуктором, расположенным в промоторной области гена длиной 36 п.н. между позициями –21 и –92 п.н. левее точки начала транскрипции.
3. Регуляция транскрипции генов класса II представителей типа Ciliophora осуществляется при участии промоторов разного строения. Промоторы генов класса II этих организмов могут быть подразделены на три основные группы:
  - (а) промоторы, построенные по классической схеме, характерной для многих эукариот, и содержащие только ТАТА-бокс и инициатор;
  - (б) промоторы, также характерные для многих эукариот и содержащие наряду с ТАТА-боксом и инициатором ряд дополнительных регуляторных элементов, таких как СААТ-бокс, GC-бокс, различные энхансеры и репрессоры;
  - (в) промоторы, содержащие специфические регуляторные нуклеотидные последовательности, характерные для некоторых генов и групп инфузорий.
4. Наиболее адекватным методом определения точек начала транскрипции как в генах тубулина *S. lemnae*, так и в некоторых других генах брюхожесничных инфузорий является сопоставление результатов секвенирования и обратной транскрипции. При этом обязательным условием при подготовке материала для проведения секвенирования является фосфорилирование праймеров нерадиоактивным фосфором.

**Научная новизна результатов работы.** В результате проведенной экспериментальной работы получены данные, расширяющие представление о механизмах регуляции транскрипции генов класса II представителей типа Ciliophora.

1. Впервые для промоторной области гена  $\alpha 1$ -тубулина *S. lemnae* описаны такие классические эукариотические регуляторные нуклеотидные последовательности, как СААТ-бокс, ТАТА-бокс и инициатор.
2. Впервые для генов класса II инфузорий-спиротрих на примере гена  $\alpha 1$ -тубулина *S. lemnae* были экспериментально найдены и описаны дополнительные регуляторные нуклеотидные последовательности ДНК – энхансер и репрессор.
3. Впервые для генов класса II инфузорий-спиротрих путем экспериментального анализа генов  $\alpha 1$ - и  $\alpha 2$ -тубулина *S. lemnae* была локализована нуклеотидная

последовательность в составе основного промотора, контролирующая индукцию транскрипции гена  $\alpha 2$ - тубулина.

**Теоретическая и практическая ценность работы.** Результаты проведенных исследований вносят значительный вклад в изучение механизмов регуляции транскрипции генов класса II представителей типа Ciliophora.

С использованием экспериментальных подходов впервые полностью проанализирован промотор генов класса II инфузорий на примере гена  $\alpha 1$ -тубулина *S. lemnae*. Описаны такие классические эукариотические регуляторные элементы, как инициатор, ТАТА-бокс, СААТ-бокс, энхансер и репрессор. При этом инициатор, энхансер и репрессор были описаны для генов класса II инфузорий впервые. Сделаны выводы о классическом механизме регуляции транскрипции в ряде генов класса II инфузорий, характерном для многих эукариот.

Экспериментальное изучение механизмов индукции гена  $\alpha 2$ -тубулина *S. lemnae* при обработке инфузорий конканавалином А позволило найти специфический регуляторный элемент в составе промотора гена, контролирующий увеличение интенсивности синтеза мРНК.

На основе экспериментальных и сравнительно-молекулярных исследований сделана попытка классифицировать возможные варианты механизмов регуляции транскрипции генов класса II инфузорий.

Метод котрансфекции инфузорий искусственными векторами, содержащими необходимые мутации, применим для изучения функциональной роли любых нуклеотидных последовательностей во всех макронуклеарных генах инфузорий-спиротрих.

**Апробация работы.** Материалы диссертации были представлены на 21-м ежегодном съезде Немецкого протозоологического общества (Германия, г. Констанц, 2002) и научных семинарах Лаборатории цитологии одноклеточных организмов Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2005, 2006 и 2007).

**Финансовая поддержка работы** была получена от Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 03-04-48505, 04-04-49209, 07-04-00662).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 3 печатные работы, в том числе 1 статья в рецензируемом российском журнале «Цитология» и 1 статья в международном рецензируемом журнале «Eukaryot. Cell» (импакт-фактор 4,303).

**Структура и объем диссертации.** Диссертация объемом 106 страниц включает введение, 4 главы, выводы, список литературы (147 названий), 27 рисунков и 2 таблицы.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы подробно рассматривается организация ядерного и генетического аппарата представителей типа Ciliophora и, в частности, инфузорий-спиротрих. Анализируются литературные данные относительно механизмов регуляции транскрипции генов класса II как у эукариотических организмов в целом, так и у представителей типа Ciliophora. Рассматриваются основные подходы в изучении строения промоторов генов класса II, делаются выводы о малой изученности механизмов регуляции транскрипции у инфузорий, обосновывается удобство и необходимость применения экспериментальных подходов при изучении регуляции транскрипции генов класса II спиротрих.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Объект исследования.** Использован клон инфузории *S. lemnae*, полученный в результате скрещивания двух клонов, один из которых был выделен из природных популяций водоема в г. Дорум (Dorum) в северной Германии, другой – из природных популяций водоема в г. Петергофе (Россия). Инфузорий культивировали в минеральной среде Прингсгейма, в качестве корма использовали одноклеточные водоросли *Chlorogonium sp.* (Ammermann et al., 1974).

**Светооптические методы исследования инфузорий.** Прижизненное изучение инфузории *S. lemnae* и микрофотосъёмку проводили с использованием микроскопа Amplival с полуавтоматической фотонасадкой MF-matic и микроскопа МБС-9.

**Для электронной микроскопии** инфузорий фиксировали в 1.5 – 3.0%-ном растворе глутаральдегида в 0.1 М кокодилатном буфере (1 ч при 0° С). Затем клетки постфиксировали в 1-2%-ном растворе OsO<sub>4</sub> в 0.1 М кокодилатном буфере (1 ч при 0° С), обезвоживали и заключали в смесь Аралдита с Эпоном. Ультратонкие срезы получали с помощью ультрамикротомы LKB III, окрашивали уранил-ацетатом и цитратом свинца и изучали с использованием электронных микроскопов JEM-7A и JEM-100C.

**Исследуемые гены.** Минихромосомы, несущие гены  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ -,  $\beta 1$ -,  $\beta 2$ -тубулина, а также белка теплового шока 70 и катепсина, выделены и клонированы в плазидах pUC12 и pTZ18U E. Хельфтенбайном и Е. Мюллером (Helftenbein, Muller, 1988) и получены нами из коллекции доктора Штайнбрюка (Steinbruck, Зоологический ин-т Тюбингенского ун-та, Германия).

Для клонирования всех использовавшихся конструкций использованы минихромосомы  $\alpha 1$ -wt и  $\alpha 2$ -wt, содержащие гены  $\alpha 1$ - и  $\alpha 2$ -тубулина *S. lemnae*, соответственно. Конструкция pTuba1f клонирована ранее (Skovorodkin et al., 1999) и представляет собой ген  $\alpha 1$ -тубулина *S. lemnae* с меткой 19 п.н., вставленной в кодирующий участок в позицию 66 п.н. правее точки начала трансляции.

**Трансфекцию вегетативных клеток *S. lemnae*** проводили с помощью метода микроинъекции в макронуклеус искусственных минихромосом – линейных векторов, снабженных теломерами (Skovorodkin et al., 1999). Для трансформации инфузорий использовали метод котрансфекции, для чего в макронуклеус инфузории инъецировали одновременно векторы двух типов, созданных на основе минихромосом, несущих ген  $\alpha 1$ -тубулина. Оба вектора содержали в кодирующей области олигонуклеотидную вставку, которая позволяла отличать их друг от друга и от нативных макронуклеарных минихромосом *S. lemnae*. Количество копий каждого из векторов, инъецируемых в клетку, приблизительно соответствовало количеству нативных минихромосом  $\alpha 1$ -тубулина (около 100000 копий).

**Выделение плазмидной ДНК *E. coli*** осуществляли либо при помощи набора реактивов QIAprep Miniprep Kit по стандартному протоколу фирмы-производителя, либо при помощи экспресс-метода выделения плазмидной ДНК (Speedprep) (Goode, Feinstein, 1992; Ausubel et al., 1998).

Реакции рестрикции и лигирования ДНК, фосфорилирования и дефосфорилирования олигонуклеотидов, обработку ДНК ферментом Кленова, электрофорез в агарозном и полиакриламидном гелях и большинство других молекулярно-биологических процедур выполняли по стандартным методикам (Sambrook et al., 1989) и протоколам фирм-производителей соответствующих реактивов.

**Аmplификацию ДНК** проводили с помощью метода ПЦР в присутствии фермента Exrand (Roche, Германия), обеспечивающего наименьшую частоту ошибок, или Taq-полимеразы (Peflab, Германия). Температуру отжига праймеров и время элонгации ДНК в каждом случае определяли эмпирически.

**Выделение ДНК из трансформированных инфузорий.** Для выделения суммарной ДНК *S. lemnae* необходимое количество инфузорий собирали на фильтре, переносили в буфер для протеиназы К, после чего производили депротеинизацию с последующей экстракцией фенолом и осаждением этанолом. РНК удаляли, обрабатывая пробы РНК-азой А.

**Выделение РНК из трансформированных инфузорий.** Для выделения суммарной РНК *S. lemnae* необходимое количество инфузорий собирали на фильтре, переносили в буфер для протеиназы К, после чего производили депротеинизацию с последующей экстракцией фенолом и осаждением этанолом.

**Оценка интенсивности транскрипции инъецированных конструкций.**

Интенсивность транскрипции генов  $\alpha 1$ - и  $\alpha 2$ -тубулина в исследуемых векторах оценивали опосредованно по соотношению количеств мРНК. С этой целью тотальную РНК трансформированных инфузорий выделяли методом, описанным выше. мРНК, синтезированную на основе инъецированных конструкций, а также собственную мРНК  $\alpha 1$ - и  $\alpha 2$ -тубулина инфузорий анализировали с помощью реакции обратной транскрипции, продукты которой наносили на 6%-ный полиакриламидный (ПАА) гель. Количественные соотношения исследуемых мРНК определяли, оценивая оптическую плотность электрофоретических полос с помощью программы TotalLab.

**Индукция синтеза тубулина.** Принцип метода индукции синтеза тубулина состоит в том, что конканавалин А, связываясь с рецепторами на поверхности ресничек, вызывает их склеивание. Клетки становятся неподвижными. Однако если удалить из среды конканавалин, они вновь обретают подвижность благодаря формированию новых ресничек (Frisch et al., 1976). В клетках, регенерирующих реснички, усиливается транскрипция генов тубулина. Индукцию синтеза тубулина проводили по методу Витте (Witte et al, 1995).

**Определение точки начала транскрипции.** Точку начала транскрипции в исследуемых генах определяли с использованием реакций секвенирования и обратной транскрипции. В случае анализа продуктов этих реакций на одном ПАА геле при использовании одних и тех же праймеров продукты реакции секвенирования являются размерным маркером, сопоставление которого с продуктами реакции обратной транскрипции дает возможность говорить о точном местоположении нуклеотида, с которого начинается синтез мРНК.

## ГЛАВЫ 3 и 4. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Светооптические и электронно-микроскопические исследования инфузорий

Негативы с фотографиями общего вида *S. lemnae*, а также электронные фотографии ультраструктуры Ма *S. lemnae*, были любезно предоставлены И.Н. Сквородкиным. Ядерный аппарат вегетативной особи *S. lemnae* представлен двумя Ми и одним гантелевидным Ма, узкая перемычка которого содержит пучки микрофиламентов. Оболочка Ма имеет классическое двухмембранное строение. На ультратонких срезах хроматин Ма организован в виде сети анастомозирующих тяжей, среди которых выявляется несколько крупных ядрышек. При делении Ма во время фазы сферического тела хроматиновые тяжи утрачивают связь с внутренней



мембраной ядерной оболочки, к которой они были прикреплены в остальных фазах клеточного цикла.

### **Делеционный анализ 5'-некодирующего участка гена $\alpha$ 1-тубулина *S. lemnae***

Для определения участков в 5'-нетранскрибируемой области гена  $\alpha$ 1-тубулина, содержащих элементы промотора, были синтезированы четыре конструкции, в которых последовательно частями были удалены интересующие последовательности между 5'-теломером и точкой начала транскрипции (рис. 2).

В конструкции Del-1 были удалены первые 40 п.н. от 5'-теломера. В конструкциях Del-2, Del-3 и Del-4 были удалены первые 99, 119 и 144 п.н., соответственно.

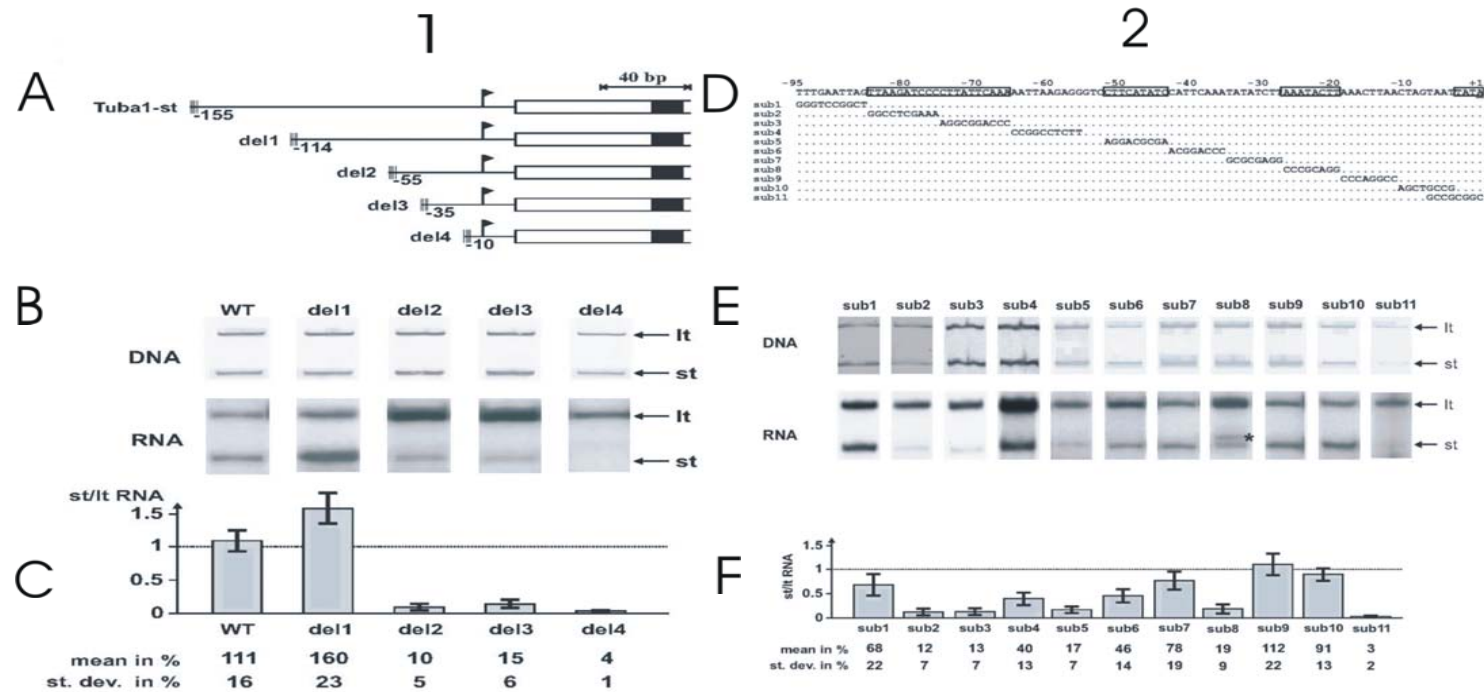
Таким образом было показано, что удаление последовательности между 5'-теломером и позицией –114 п.н. левее точки начала транскрипции приводит к достоверному увеличению уровня синтеза мРНК (Del 1, рис. 2). Одновременно с этим снижение эффективности транскрипции наблюдали при удалении последовательностей между 5'-теломером и позициями –55, –35 и –11 п.н. (Del 2, Del 3 и Del 4, рис. 2).

Характер изменения уровня синтеза мРНК на конструкции Del 1 свидетельствует о наличии в указанной области гена нуклеотидной последовательности, оказывающей на транскрипцию подавляющее воздействие. Основываясь на литературных данных о механизмах сборки транскрипционного комплекса и особенностях ее регуляции, можно утверждать, что в области между теломером и позицией –114 п.н. расположен репрессор, ранее не описанный у инфузорий.

Значительное снижение эффективности транскрипции при удалении последовательности между 5'-теломером и позицией –11 п.н. (Del 4, рис. 2) показывает, что последовательность между позицией –114 п.н. и точкой начала транскрипции содержит элементы промотора, присутствие которых необходимо для корректной транскрипции гена.

### **Анализ 5'-некодирующего участка гена $\alpha$ 1-тубулина *S. lemnae* с помощью конструкций, несущих нуклеотидные замены**

С целью дальнейшего изучения области промотора гена  $\alpha$ 1-тубулина был проведен анализ этой области с помощью замен нуклеотидов, что позволило точнее определить границы участков, содержащих регуляторные последовательности. Замены производили по следующему правилу: нуклеотид А заменяли на нуклеотид С и наоборот, а нуклеотид Т заменяли на нуклеотид G и наоборот. Были синтезированы одиннадцать конструкций, каждая из которых содержала блок нуклеотидных замен в определенном участке анализируемой области промотора между –95 п.н. и +2 п.н. относительно точки начала транскрипции (рис. 2). Используя конструкции pSub-1, pSub-2, pSub-3, pSub-4, pSub-5, pSub-6, pSub-7, pSub-8, pSub-9, pSub-10, pSub-11 для получения линейных векторов, были произведены эксперименты по котрансфекции клеток этими векторами и контрольным вектором Tuba1g-lt.



**Рис. 2.** Экспериментальный анализ промоторной области гена  $\alpha$ 1-тубулина *Styloenchia lemnae* с помощью искусственных конструкций, несущих делеции и нуклеотидные замены (по: Skovorodkin, Pimenov et al., 2007).

**1** – Делеционный анализ 5'-некодирующего участка гена  $\alpha$ 1-тубулина *S. lemnae*.

**A** – Общая схема произведенных делеций. Белые прямоугольники – кодирующая область гена, черные прямоугольники – вставки 19 п.н., точка начала транскрипции обозначена флажком, одинарная линия – 5'-некодирующая область гена.

**B, E** – Анализ продуктов реакции обратной транскрипции и ПЦР с использованием мутантных векторов и нативных минихромосом, несущих ген  $\alpha$ 1-тубулина. **C, F** – Соотношения интенсивности электрофоретических полос, соответствующих продуктам реакции обратной транскрипции и ПЦР на основе мутантных векторов со вставкой 19 п.н. (**st**) и векторов со вставкой 49 п.н. (**It** – контроль).

**2** – Анализ 5'-некодирующего участка гена  $\alpha$ 1-тубулина с помощью конструкций, несущих нуклеотидные замены.

**D** – Общая схема произведенных нуклеотидных замен. Представлена нуклеотидная последовательность 5'-некодирующего участка гена  $\alpha$ 1-тубулина *S. lemnae* и участки промоторной области гена, несущие нуклеотидные замены соответствующие каждой из конструкций.

В результате анализа 5'-некодирующего участка гена  $\alpha 1$ -тубулина с помощью несущих замены конструкций было показано, что замена нуклеотидов в областях между позициями -95 и -85, -65 и -55, -35 и -26 и между позициями -19 и -4 п.н. относительно точки начала транскрипции не меняет эффективности транскрипции гена, что свидетельствует об отсутствии регуляторных последовательностей в этих областях. Замена нуклеотидов в областях между позициями -85 и -65, -52 и -34 и между -7 и +2 п.н. значительно снижает эффективность транскрипции, но никак не влияет на корректность инициации транскрипции. Замена нуклеотидов в области между -27 и -18 п.н. приводит как к снижению эффективности транскрипции, так и к появлению двух дополнительных продуктов реакции обратной транскрипции, соответствующих aberrантным точкам начала синтеза мРНК (рис. 2).

Рассмотренные участки молекулы ДНК, функциональная роль которых доказана, соответствуют локализации таких классических эукариотических элементов промотора, как инициатор (+2 -7 п.н.), ТАТА-бокс (-20 -27 п.н.) и СААТ-бокс (-44 -52 п.н.). Основываясь на литературных данных относительно строения классического эукариотического промотора генов класса II и нуклеотидного состава консервативных регуляторных элементов, можно сделать выводы о точном местоположении этих последовательностей в гене  $\alpha 1$ -тубулина *S. lemnae*. Так, СААТ-бокс, определяемый по формуле 5'-GG(T/C)СААТСТ-3', имеет нуклеотидный состав САТАТ (-45 -49 п.н.), ТАТА-бокс, определяемый по формуле 5'-ТАТА(А/Т)А(А/Т)-3', - ТАААТА (-23 -28 п.н.), инициатор, определяемый по формуле УУАНТ/АУУ, - ТАТАА, где второй нуклеотид А - точка начала транскрипции (рис. 2). Таким образом, основываясь на полученных данных, можно говорить о том, что регуляция транскрипции гена  $\alpha 1$ -тубулина осуществляется по стандартной схеме с участием ТАТА-бокса и инициатора транскрипции.

Интересным фактом является то, что замена нуклеотидов в области между -27 и -18 п.н., то есть в области ТАТА-бокса, привела не только к снижению количеств синтезированной мРНК, но и к появлению дополнительных продуктов реакции обратной транскрипции, соответствующих aberrантным точкам начала транскрипции (рис. 2). Причина этого может состоять в распределении функций регуляции между ТАТА-боксом и инициатором. В норме функция присоединения фактора транскрипции TFIID и, соответственно, точного определения точки начала синтеза мРНК лежит на ТАТА-боксе. В его отсутствие, инициатор выступает как нуклеотидная последовательность, определяющая точку начала транскрипции. Действительно, в случае нарушения нуклеотидной последовательности ТАТА-бокса ТАТА-бокс связывающий белок (ТСБ) может связываться с молекулой ДНК с некоторым смещением, что приводит к неточному присоединению ТСБ - ассоциированных факторов (ТАФ). В результате вся функция определения точки начала транскрипции ложится на ТАФ, которые взаимодействуют с подходящими нуклеотидными последовательностями ТАА, присутствующими в необходимой области мутантной минихромосомы. Таких нуклеотидных последовательностей в гене  $\alpha 1$ -тубулина три, что соответствует трем образующимся точкам начала транскрипции.

При нарушении нуклеотидной последовательности инициатора и сохранении ТАТА-бокса снижение интенсивности транскрипции может быть вызвано тем, что ТСБ, распознавая необходимую последовательность, связывается с молекулой ДНК точно в области ТАТА-бокса. Это взаимодействие пространственно обуславливает место присоединения ТАФ, эффективность взаимодействия которых с молекулой ДНК резко падает в отсутствие необходимой нуклеотидной последовательности ТАА инициатора.

Как показано в экспериментах с нуклеотидными заменами в области промотора гена  $\alpha 1$ -тубулина, в регуляции синтеза мРНК принимают участие и дополнительные нуклеотидные последовательности, такие как СААТ-бокс.

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

Анализ 5'-некодирующего участка гена  $\alpha 1$ -тубулина с помощью несущих замены конструкций позволил идентифицировать еще одну функционально значимую последовательность, нарушение нуклеотидного состава которой приводит к достоверному снижению интенсивности транскрипции. Участок молекулы ДНК, расположенный между  $-85$  и  $-65$  п.н. левее точки начала транскрипции, по своему расположению соответствует так называемым дополнительным элементам регуляции, среди которых у эукариот наиболее часто встречается GC-бокс, или энхансер (Hoffman et al., 1995; Жимулев, 2002). Местоположение этих элементов не является одинаковым для разных генов и варьирует в районе 50-150 п.н. левее точки начала транскрипции. В гене  $\alpha 1$ -тубулина *S. lemnae* дополнительный регуляторный элемент, работающий по принципу энхансера, расположен внутри нуклеотидной последовательности ТТААGATCCCCTTATCAAA ( $-65$  и  $-86$  п.н.) (рис. 2). Сопоставление рассматриваемых данных с литературными данными относительно регуляции транскрипции генов класса II эукариотических организмов позволяет утверждать, что в промоторе гена  $\alpha 1$ -тубулина *S. lemnae* присутствует GC-бокс. Допуская возможность некоторых отклонений от классической нуклеотидной последовательности GC-бокса, которая представлена нуклеотидами 5'-GGGCGGG-3' или 5'-CCCGCCC-3', можно сделать предположение, что в гене  $\alpha 1$ -тубулина *S. lemnae* GC-бокс представлен нуклеотидами GATCCC, расположенными между позициями  $-75$  и  $-82$  п.н. (рис. 2).

### **Определение точек начала транскрипции в генах инфузорий-спиротрих**

В результате секвенирования исследуемых генов –  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ -,  $\beta 1$ -,  $\beta 2$ -тубулина, белка теплового шока 70 и катепсина – были определены нуклеотидные последовательности в области точек начала транскрипции и трансляции. Во всех случаях определенные таким образом нуклеотидные последовательности совпадали с установленными ранее при секвенировании соответствующих минихромосом (Helftenbein, 1985; Conzelmann, Helftenbein, 1987; Helftenbein, Muller, 1988; Helftenbein et al., 1989; Steinbruck, 1990).

При использовании сочетания секвенирования и обратной транскрипции, были определены точки начала транскрипции в исследуемых генах. Согласно нашим данным в генах  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ -,  $\beta 1$ -,  $\beta 2$ -тубулина, белка теплового шока и катепсина синтез

мРНК начинается с нуклеотидов, расположенных на 38, 38, 28, 36, 34 и 11 п.н. левее точки начала трансляции, соответственно (рис. 3).

В ходе экспериментов по определению точек начала транскрипции нами было обнаружено, что в случае использования в реакции секвенирования нефосфорилированных праймеров, что рекомендуется стандартным протоколом, на получаемой фотографии ПАА геля наблюдается явный сдвиг электрофоретических полос, который затрудняет точное толкование результата. Мы определили, что причина этого состоит в присутствии фосфорилированных групп на 5'-конце праймеров, используемых в реакции обратной транскрипции, и их отсутствии у праймеров для секвенирования. Такого сдвига полос можно избежать при использовании в реакции секвенирования праймеров, фосфорилированных нерадиоактивным фосфором.

Результаты, полученные нами при экспериментальном определении точек начала транскрипции в генах тубулина инфузории *S. lemnae*, отличаются от ранее опубликованных данных (Helftenbein, 1985; Conzelmann, Helftenbein, 1987; Helftenbein, Muller, 1988; Helftenbein et al., 1989; Steinbruck, 1990; Skovorodkin et al., 1999). При этом в рассматриваемой литературе также наблюдаются некоторые расхождения в результатах экспериментов по определению нуклеотидов, с которых начинается синтез мРНК. Классическим способом определения точек начала транскрипции, популярным у большинства исследователей, является так называемый метод "S<sub>1</sub> nuclease mapping", основанный на гибридизации меченных по 5'- или 3'-концу двухцепочечных фрагментов молекулы ДНК и тотальной РНК организма с последующим расщеплением двухцепочечных молекул нуклеазой S<sub>1</sub> (Conzelmann, Helftenbein, 1987; Helftenbein, Muller, 1988). Существует вероятность того, что ДНК-РНК-гибридизация может происходить неоднозначно при различных повторностях опыта в виду образования разного рода петель и шпилек в молекуле РНК, что допускается температурным режимом реакции. В результате, комплекс ДНК-РНК и, следовательно, конечный продукт расщепления может варьировать по длине, что приведет к неправильному определению точки начала транскрипции.

Другой вариант определения точек начала транскрипции, опробованный на ряде генов инфузорий родов *Euplotes* и *Stylonychia* и основанный на совместном использовании реакций обратной транскрипции и секвенирования, дает возможность избежать ошибок и неточностей метода "S<sub>1</sub> nuclease mapping", однако также таит в себе ряд трудностей. Обнаруженный нами сдвиг электрофоретических полос, соответствующих продуктам реакции обратной транскрипции, относительно электрофоретических полос реакции секвенирования на ПАА геле при использовании стандартных протоколов делает невозможным точное определение нуклеотида, с которого начинается синтез мРНК. Именно это, по нашему мнению, и явилось причиной неточностей и отсутствия однозначных выводов в опубликованных ранее работах (Kaufmann, Klein, 1992; Ghosh et al., 1994; Bender, Klein, 1997; Skovorodkin et al., 1999).

Основываясь на полученных данных, мы пришли к заключению, что наиболее адекватным и точным методом определения точек начала транскрипции как в генах тубулина *S. lemnae*, так и в ряде других генов брюхожесничных инфузорий является совместное использование реакций секвенирования и обратной транскрипции. При этом обязательным шагом при подготовке материала для реакции секвенирования является фосфорилирование праймеров нерадиоактивным фосфором.

### **Индукция транскрипции генов $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -тубулина инфузории *S. lemnae***

Для проведения экспериментов по изучению механизмов, контролирующих индукцию транскрипции гена  $\alpha 2$ -тубулина *S. lemnae*, была создана конструкция, в которой участок 5'-некодирующей области гена  $\alpha 1$ -тубулина между позициями –21 и –174 п.н. относительно точки начала транскрипции был заменен на нуклеотидную последовательность из промоторной области гена  $\alpha 2$ -тубулина, расположенную между позициями –21 и –92 п.н. относительно точки начала транскрипции. Выбор области замен определялся, с одной стороны, предположением о том, что регуляторный элемент, контролирующий индукцию  $\alpha 2$ -тубулина, расположен в промоторной области гена, а, с другой стороны, необходимостью исключить возможное влияние различий в стабильности мРНК  $\alpha 1$ - и  $\alpha 2$ -тубулина.

В результате анализа мРНК инфузорий, не обработанных конканавалином А, которые использовались в качестве контроля, и мРНК инфузорий, обработанных конканавалином А, было показано, что ген  $\alpha 2$ -тубулина индуцируется в большей степени, чем ген  $\alpha 1$ -тубулина, что согласуется с данными литературы (Witte et al., 1995). Анализ мРНК, синтезированной на мутантной конструкции, показал, что транскрипция данной искусственной минихромосомы и гена  $\alpha 2$ -тубулина индуцировалась при воздействии конканавалина А одинаково. Таким образом было показано, что индукция транскрипции гена  $\alpha 2$ -тубулина контролируется последовательностью промотора длиной 36 п.н., расположенной между позициями –21 и –92 п.н. относительно точки начала транскрипции.

### **Сравнение экспериментальных данных по строению промотора гена $\alpha 1$ -тубулина *S. lemnae* с данными по другим генам инфузорий-спиротрих**

Сопоставление экспериментальных данных по трансформации инфузории *S. lemnae* векторами, синтезированными на основе минихромосы, несущей ген  $\alpha 1$ -тубулина, с данными по другим генам *S. lemnae*, точка начала транскрипции в которых была определена нами экспериментально, дает возможность говорить об идентичности нуклеотидного состава ТАТА-боксов и инициаторов в этих генах (рис. 3).

Действительно, ТАТА-бокс в генах  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ - и  $\beta 2$ -тубулина представлен последовательностью ТААТА, расположенной в случае генов  $\alpha 1$ - и  $\alpha 2$ -тубулина в позиции –23 п.н., а в случае  $\beta 2$ -тубулина – в позиции –24 п.н. относительно точки начала транскрипции. Строение ТАТА-боксов в промоторе гена  $\beta 1$ -тубулина несколько отличается, он представлен нуклеотидами ТАТАА, расположенными в позиции –24 п.н. относительно точки начала транскрипции (рис. 3).

Определение точек начала транскрипции в генах  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ -,  $\beta 1$ -,  $\beta 2$ -тубулина *S. lemnae*, а также катепсина и белка теплового шока 70, позволило охарактеризовать нуклеотидную последовательность инициатора – классического регуляторного элемента, функциональное значение которого в гене  $\alpha 1$ -тубулина было нами экспериментально доказано. При сравнительном анализе данных видно присутствие сходных нуклеотидных последовательностей в области нуклеотида, с которого начинается синтез мРНК (рис. 3). Так, в генах катепсина,  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ - и  $\beta 2$ -тубулина это нуклеотидная последовательность ТАТАА, в генах  $\beta 1$ -тубулина и белка теплового шока последовательность несколько иная – АТТАА. Однако во всех генах присутствует последовательность ТАА, где первый нуклеотид А является точкой начала транскрипции (рис. 3).

$\alpha$ 1- тубулин	ATCT <u>TAAATA</u> CTTAAACTTA ACTAGTAAT <u>TATAA</u> TTATTTT CATTTTTTCA AACAAAAATCA ACTCTTCATC <b>ATG</b>								
	-32	-22	-12	-2 0	+7	+17	+28	+38	
$\alpha$ 2- тубулин	CC <u>TATAAATA</u> GCGAAATAAA GTGGGAAAT <u>TATAA</u> CTTTAT TTTATATTTAA AACAAAAATCA AATCTTCATC <b>ATG</b>								
	-32	-22	-12	-2 0	+7	+17	+28	+38	
$\beta$ 1- тубулин	TAAATTTTAA ATTTCAGAGAA TGAAT <u>TATAAG</u> GATACCAATT TTAAGAAGTA <u>TATAA</u> TTATTC TTAATTTTCA AAAACAAAAC <b>ATG</b>								
		-32	-22	-12	-2 0	+7	+17	+28	
$\beta$ 2- тубулин	TGT <u>TATAAAT</u> ATGCGCCCTC TCTAACTAAT <u>TATAA</u> TTCA AATAATTTTC AAAACAAAAC TCAAGTCACA <b>ATG</b>								
	-34	-24	-14	-4 0	+5	+15	+25	+35	
Катепсин				<u>TAA TTA</u> TAGTCAC TAGGATCCAA ATTAAT <u>TATAA</u> TTAATTATA <b>ATG</b>					
				-29	-19	-9	0	+10	
белок теплового шока Hsp70	TCATTAT TTAAGAGCGC TTAGTAAAT CAAG <u>TATAA</u> TT TGTAAATAA AGATACCCTA ACAAACACAA <b>ATG</b>								
		-27	-17	-7	0 +2	+12	+22	+32	
	-70	-60	-50	-40	-30	-20	-10	0	

**Рис. 3.** Сравнительный анализ промоторных областей генов тубулина, белка теплового шока 70 и катепсина инфузории *Stylonychia lemnae*.

Представлены нуклеотидные последовательности 5'-некодирующих участков минихромосом. Триплеты **ATG**, с которых начинается кодирующая область генов, выделены жирным шрифтом, точки начала транскрипции, определенные экспериментально, подчеркнуты одинарной линией, предполагаемые нуклеотидные последовательности инициаторов транскрипции заключены в рамки, предполагаемые нуклеотидные последовательности ТАТА-боксов подчеркнуты одинарной линией.

Эти данные позволяют утверждать, что по крайней мере в исследованных генах инфузории *S. lemnae* присутствует консервативный эукариотический регуляторный элемент – инициатор, ранее не описанный у инфузорий. При этом, в нуклеотидный состав инициатора входит последовательность ТАА, в которой первый нуклеотид А является точкой начала транскрипции.

Сходство нуклеотидного состава ТАТА-бокса и инициатора в исследованных генах побудило нас провести сравнительно-молекулярный анализ и других генов брюхожесничных инфузорий, точка начала транскрипции в которых была определена другими авторами. Наряду с этим мы решили исследовать промоторные области в генах  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ -,  $\beta 1$ - и  $\beta 2$ -тубулина, а также катепсина и белка теплового шока у таких представителей типа Ciliophora, как *Euplotes*, *Sterkiella (Oxytricha)*, *Paramecium* и *Tetrahymena*.

Основываясь на сравнительном анализе нуклеотидных последовательностей, окружающих точку начала транскрипции, в генах, исследованных другими авторами, можно распространить гипотезу о наличии инициатора и на другие гены брюхожесничных инфузорий родов *Stylonychia* и *Sterkiella (Oxytricha)*. Так, консервативная последовательность инициатора ТАТАА была найдена во всех 9 исследованных генах инфузорий рода *Stylonychia* и в 6 из 9 генах инфузорий рода *Sterkiella (Oxytricha)*. В трех генах инфузорий рода *Sterkiella (Oxytricha)* было обнаружено смещение консервативной последовательности инициатора на 3 п.н. относительно точки начала транскрипции. Эти данные позволяют утверждать, что, по крайней мере, в исследованных генах присутствует консервативный эукариотический регуляторный элемент – инициатор, ранее не описанный у инфузорий.

Поиск ТАТА-букс-подобных последовательностей в представленных генах инфузорий родов *Stylonychia* и *Sterkiella (Oxytricha)* дал более противоречивые результаты. ТАТА-букс, имеющий консервативную последовательность ТААТА, установленную нами в результате анализа генов  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ -,  $\beta 1$ - и  $\beta 2$ -тубулина *S. lemnae*, был обнаружен только в трех из шести генах инфузорий родов *Stylonychia* и в пяти из восьми генах инфузорий рода *Sterkiella (Oxytricha)*.

В ходе сравнительно-молекулярного анализа нуклеотидных последовательностей промоторных областей в генах  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ -,  $\beta 1$ - и  $\beta 2$ -тубулина, а также катепсина и белка теплового шока, у таких представителей типа Ciliophora, как *Euplotes*, *Sterkiella (Oxytricha)*, *Paramecium* и *Tetrahymena*, мы столкнулись с тем, что в указанных генах точка начала транскрипции еще не определена ни одним исследователем. В соответствии с этим на основании имеющихся нуклеотидных последовательностей нами были сделаны предположения относительно нуклеотидного состава ТАТА-бокса и инициатора, а также местоположения точки начала транскрипции. В результате, нуклеотидные последовательности, которые могли бы соответствовать инициатору, были обнаружены в 10 генах из 13. В соответствии с предполагаемым положением точки начала транскрипции ТАТА-букс-подобные последовательности были обнаружены в 7 генах.

Подводя итог сравнительно-молекулярному анализу генов класса II различных представителей типа Ciliophora, можно прийти к выводу, что, по крайней мере, в ряде генов этих животных присутствуют такие классические нуклеотидные последовательности, как инициатор и ТАТА-букс. При этом поиск этих элементов регуляции транскрипции с помощью сравнительно-молекулярных методов возможен только тогда, когда точка начала транскрипции определена экспериментально. В этом случае, при нахождении классических последовательностей ТАТА-бокса и



инициатора, можно говорить о механизмах регуляции транскрипции в исследуемых генах.

Наряду с ТАТА-боксом и инициатором в состав промотора генов класса II инфузорий могут входить дополнительные элементы регуляции, как консервативные для эукариот (СААТ-бокс и GC-бокс), так и специфические (энхансеры и репрессоры). Определение присутствия, нуклеотидного состава и местоположения дополнительных элементов регуляции возможно только экспериментально ввиду сильной вариабельности их нуклеотидного состава.

## ВЫВОДЫ

1. У инфузории *Stylonychia lemnae* 5'-некодирующая область минихромосомы, несущей ген  $\alpha 1$ -тубулина, содержит следующие нуклеотидные последовательности, необходимые для корректной инициации транскрипции:
  - (а) инициатор, имеющий нуклеотидный состав ТАТАА, где второй нуклеотид А – точка начала транскрипции;
  - (б) классический ТАТА-бокс, представленный нуклеотидной последовательностью ТАААТА и расположенный между позициями –23 и –28 п.н. левее точки начала транскрипции;
  - (в) СААТ-бокс, имеющий нуклеотидный состав САТАТ и расположенный между позициями –45 и –49 п.н. левее точки начала транскрипции;
  - (г) энхансер – GC-бокс, имеющий нуклеотидный состав GATCCC и расположенный между позициями –75 и –82 п.н. левее точки начала транскрипции;
  - (д) репрессор, расположенный между позициями –155 и –114 п.н. левее точки начала транскрипции.
2. Способность гена  $\alpha 2$ -тубулина инфузории *S. lemnae* к индукции лектином конканавалином А регулируется индуктором, расположенным в промоторной области гена длиной 36 п.н. между позициями –21 и –92 п.н. левее точки начала транскрипции.
3. Регуляция транскрипции генов класса II у представителей типа Ciliophora осуществляется при участии промоторов разного строения. Промоторы генов класса II этих организмов могут быть подразделены на три основные группы:
  - (а) промоторы, построенные по классической схеме, характерной для многих эукариот, и содержащие только ТАТА-бокс и инициатор;
  - (б) промоторы, также характерные для многих эукариот и содержащие наряду с ТАТА-боксом и инициатором ряд дополнительных регуляторных элементов, таких как СААТ-бокс, GC-бокс, различные энхансеры и репрессоры;
  - (в) промоторы, содержащие специфические регуляторные нуклеотидные последовательности, характерные для некоторых генов и групп инфузорий.
4. Наиболее адекватным методом определения точек начала транскрипции как в генах тубулина *S. lemnae*, так и в некоторых других генах брюхожесничных инфузорий является сопоставление результатов секвенирования и обратной транскрипции. При этом обязательным условием при подготовке материала для проведения секвенирования является фосфорилирование праймеров нерадиоактивным фосфором.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Pimenov A.**, Zassoukhina I. B., Ammermann D., Skovorodkin I. N. 2002. Characterization of transcription initiator in alpha and beta tubulin genes of *Stylonychia lemnae*. In: 21 Jahrestagung der deutschen Gesellschaft fuer Protozoologie. Konstanz. 35.
2. **Пименов А.Ю.**, Райхель И.Б., Сковородкин И.Н., Подлипаева Ю.И., Скарлато С.О. 2006. *Stylonychia lemnae* – модельный объект для изучения минихромосом макронуклеуса инфузорий. Цитология. **48**(8): 619-635.
3. Skovorodkin I., **Pimenov A.**, Raykhel I., Schimanski B., Ammermann D., Günzl A. 2007. Analysis of  $\alpha$ -tubulin minichromosome promoters in the stichotrichous ciliate *Stylonychia lemnae*. Eukaryot. Cell. **6**: 28-36

## СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Догель В.А. 1981. Зоология беспозвоночных. М.: Высшая школа. 606 с.; Жимулев И.Ф. 2002. Общая и молекулярная генетика. Новосибирск: Изд-во. Новосиб. ун-та. 459 с.; Осипов Д.В. 1981. Проблемы гетероморфизма ядер у одноклеточных организмов. Л.: Наука. 167 с.; Райков И. Б. 1978. Ядро простейших. Морфология и эволюция. Л.: Наука. 328 с.; Райхель И.Б. 2003. Регуляторные участки ДНК в минихромосомах инфузории *Stylonychia lemnae*, несущих гены  $\alpha$ 1- и  $\beta$ 2-тубулина: Автореф. канд. дисс. СПб: СПб гос. политех. ун-т. 26 с.; Ammermann D. et al. 1974. Chromosoma. **45**: 401-429; Ausubel F.M. et al., 1989. Current protocols in molecular biology; Green Publ. Ass.; Barberis A. et al. 1987. Cell. **50**: 347-359; Berger J.D. 1982. Exp. Cell Res. **141**: 261-275; Brusca R., Brusca G. 2002. Invertebrates. 2nd ed. p. 936; Carcamo J. et al. 1991. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **88**: 8052-8056; Conzelmann K.K., Helftenbein E. 1987. J. Mol. Biol. **198**: 643-653; Frisch A. et al. 1976. J. Protozool. **23**: 427-430; Ghosh S. et al. 1994. Nucl. Acids Res. **22**: 214-221; Goode B.L., Feinstein S.C. 1992. BioTechniques. **12**: 148-149; Graves B.J. et al. 1986. Cell. **44**: 565-576; Helftenbein E. 1985. Nucl. Acids Res. **13**: 415-433; Helftenbein E. et al. 1989. Eur. J. Protistol. **25**: 158-167; Helftenbein E., Muller E. 1988. Curr. Genet. **13**: 425-432; Hoffman D.C. et al. 1995. Macronuclear gene-sized molecules of hypotrichs. Nucl. Acids Res. **23**: 1279-1283; Kaufmann J., Klein A. 1992. Nucl. Acids Res. **20**: 4445-4450; Klobutcher L.A., Prescott D.M. 1986. The special case of the hypotrichs. In: The molecular biology of ciliated protozoa. N.Y.: Acad. Press. 111-154; Lee T.H., Young R.A. 2000. Annu. Rev. Genet. **34**: 77-137; McKnight S. L., Kingsbury R. 1982. Science. **217**: 316-324; Skovorodkin I.N. et al. 1999. Europ. J. Protistol. **35**: 70-80; Sambrook J. et al. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed. **1-3** Cold Spring Harbor Lab. Press; Witte et al. 1995. Europ. J. Protistol. **31**: 268-274.