

纤毛虫大核发育过程中程序化的 DNA 消除

隋淑光 何远

(华东师范大学生物学系 上海 200062)

摘要 纤毛虫大核发育过程中发生程序性的 DNA 消除,被消除的序列为内在删除顺序及非编码区。消除以后,大核胚基中的 DNA 发生片段化,在腹毛目纤毛虫中, DNA 断裂成为只有基因大小的 DNA 分子;在四膜虫中, DNA 断裂成为平均长度约 600 kb 的片段,在断裂位点发现一个 15 bp 的顺序,为断裂位点的标志信号。通过对四膜虫小核基因组某一内在删除顺序的研究,发现此序列的删除受两套顺式作用顺序的控制。

关键词 纤毛虫; DNA 消除; 基因重组

中图分类号: Q959.11 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2000)06-42-04

Programmed DNA Deletions during Macronuclear Development in Ciliates

SUI Shu-Guang HE Yuan

(Department of Biology, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Key words Ciliates; DNA deletion; Gene recombination

纤毛原生动物中普遍发生程序性的基因重组现象。以往的研究已发现棘尾虫(*Stylonychia*)、四膜虫(*Tetrahymena*)等纤毛虫在大核胚基发育过程中都普遍发生染色体断裂、DNA 删除、DNA 的扩增等,从而使大核基因组的 DNA 含量及结构发生剧烈变化。近年来,对嗜热四膜虫(*T. thermophila*)等纤毛虫,应用生物化学及分子遗传学技术的研究已开始逐步澄清这些过程的机制。

1 纤毛虫的接合生殖过程

纤毛虫的细胞核具有两型性,其小核为二倍体,大核为多倍体,大核来自于小核。在接合生殖的过程中,小核经成熟分裂产生单倍体的配子核,在每个细胞中位于口旁的配子核称为迁移原核,远离口旁的称为静止原核。迁移原核沿细胞质桥进入对方体内,和对方的静止原核接合,成为二倍体的合子核,合子核分裂后产生的胚核中有的发育成为小核胚基,有的发育成为大核胚基,由大核胚基发育成大核。在大核发育过程中,大核胚基内发生了基因重组,有一系列的事件发生。这一系列的事件有染色体片段化(chromosome

fragmentation)、DNA 删除(DNA deletion)、基因组扩增(genome amplification)、端粒的添加(telomere addition)等,而老大核固缩,被吸收。

2 腹毛类纤毛虫的基因重组

腹毛类纤毛虫大核发育过程中有多次基因消除发生,具体过程如下。

最初是在发育中的大核胚基内的染色质凝缩而成为染色体,分布在胚基的表面。然后染色体发生分化,约有不到 1/3 的染色体进入胚基内部并解螺旋,再次成为线状。而其它的染色体继续保持凝缩状态,最终这部分染色体被降解。这是大核发育过程中发生的第一次小核基因组的消除,约消除掉了 DNA 含量的 $2/3^{[1]}$ 。其后染色体发生多线化而变为多线染色体,并出现了明显的横带。随着多线化程度的加深,多线染色体达到了最大,此时大核胚基中 DNA 的含量达到了

第一作者介绍 隋淑光,男,30岁,博士研究生,研究方向:原生动物细胞生物学;

收稿日期:1999-05-06,修回日期:1999-09-06

二倍体阶段的 16 倍^[1]。当染色体的多线化结束以后,多线染色体发生一种很奇特的现象,即染色体的片段化,大核胚基中的染色体断裂为许多片段^[7]。在此过程中,最先是出现了许多纤维状的隔膜,并穿过多线染色体的每个间带,然后相邻的隔膜汇合,从而使染色体断开,每条带都成为由纤维状外壁所包围的小囊结构,小囊结构充满了整个大核胚基^[7]。此后大核胚基中的 DNA 含量急剧下降,几乎回到二倍体阶段的水平^[1]。DNA 含量下降的原因是由于异染色质区和内在删除顺序(internal eliminated sequence, IES)的消除^[6]。此时大核经历了一个 DNA 贫乏期,从光镜水平观察,可见核胚基几乎不被核染料着色,且体积变小^[1];从电镜水平观察,可见大核胚基的小囊内致密物质的数量减少^[7]。在腹毛目纤毛虫中普遍存在内在删除顺序,Prescott 研究了尖毛虫(*Oxytricha nova*)大核胚基内的肌动蛋白基因,发现此基因由 9 个分离的片段组成,这些片段成串排列在一条染色体上,片段之间有非编码区,非编码区在大核胚基基因重组时被消除,然后这些片段再拼接在一起,成为编码区,非编码区即为内在删除顺序或称为类内含子顺序(intron-like sequence)^[8]。内在删除顺序在腹毛类纤毛虫中长度约为 100 bp,单一序列,富含腺嘌呤(A)和胸腺嘧啶(T),在尖毛虫(*Oxytricha nova*)每个基因组内约有 150 000 个内在删除顺序^[9]。

腹毛目纤毛虫大核基因组内约有 95% 的 DNA 顺序被删除掉^[9],这些顺序可大致分为几类:(1)位于基因内部的非编码区(IES),为单一序列,约有 150 000 个 IES 顺序被删除,约占总删除顺序的百分之几;(2)在一些腹毛类纤毛虫基因组中发现了几个类似转座子的家族,这些序列为重复性序列,其删除发生在多线染色体阶段,约占总删除顺序的 50%;(3)位于基因之间的非编码区的删除,此类序列为单一序列^[10]。

经过基因消除以后,大核胚基中的 DNA 成为了片段,称为基因大小的 DNA 分子或大核基因。大核胚基要通过复制带经历多轮复制以增加 DNA 分子的拷贝数,rDNA 分子则经历一种特殊的扩增以达到更高的拷贝数。大核基因大小在 400~20 000 bp 之间,平均为 2 500 bp;分子量为 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ u,平均为 1.5×10^6 u;长度为 0.2~2.2 μm ,平均为 0.8 μm 。大核基因的中部是无内含子的编码区,称为开放读码框(open reading frame, ORF),两侧是非编码区,近 5' 端的非编码区称为前导片段,近 3' 端的称为尾部片段。从碱基组成上可以很容易地区分编码区和非编码区,前导片段和尾部片段富含腺嘌呤和胸腺嘧啶,约占碱基总数的 70%~80%,而在编码区则占 50%~65%。前导顺序无疑

具有启动子功能,但在和转录起始密码子相联系的特定位置上并没有发现像 CAAT、TATTA、GC-boxes 等公认的启动子顺序^[10]。大核基因两个端部是端粒结构,端粒结构在腹毛目中是相同的,是由 5'GGGGTTTT/CCCCAAAA3' 的多个重复组成^[5]。端粒的添加由端粒酶来完成,端粒酶本身带有一段 RNA 序列,以此段序列为模板合成端粒,然后添加到大核基因的末端。在大核胚基中,不同基因的拷贝数目是不同的,多则数万,少则数千^[9]。

3 四膜虫的基因重组

3.1 染色体的片段化和内在删除顺序的删除 四膜虫大核发育过程中首先进行 DNA 扩增,扩增数小时开始发生 DNA 的删除^[9]。大核胚基内也发生染色体的片段化,但并不像棘尾虫那样断成只有基因大小的 DNA 分子。其形成约 250 个片断,平均长度为 600 kb,最小的是 rDNA 分子,为 21 kb,最大的超过 1 500 kb。片段化发生的时候 DNA 双链断开,在断开处要丢失一个小的 DNA 片断。同时,在四膜虫的小核 DNA 分子上约有 6 000 个位点发生了内在删除顺序的删除,删除以后,相邻的顺序再拼接起来^[12]。然后进行端粒的添加,形成由 30~70 个重复的如 5'GGGGTT/CCCCAA3' 寡核苷酸构成的端粒^[9]。在四膜虫大核胚基中有一个特殊的删除事件,即 rDNA 的删除,rDNA 在小核中为单拷贝,结合在小核染色体上,在大核发育过程中从小核染色体上被剪切下来,成为染色体外的核糖体基因,核糖体基因在染色体外以回纹环(palindrome)的形式存在,回纹环的中心是一个 28 bp 的顺序,其两侧为一对反向重复顺序^[4]。在每个细胞大核中,含有约 10 000 个 rDNA 分子,是其它 DNA 片段拷贝数的 300 倍。其端粒顺序由 20~70 个 5'-C₄A₂-3' 组成,由端粒酶添加在两侧,每个基因能编码 25S 和 17S 的 rRNA 转录本。经 DNA 复性动力学研究发现,嗜热四膜虫在大核发育过程中约有 15% 的小核 DNA 顺序被从大核中删除。

3.2 小核染色体的断裂机制 经过对多个断裂位点的研究,在四膜虫上发现了一个 15 bp 的顺序,称为染色体断裂顺序(chromosome breakage sequence, CBS),CBS 是断裂位点的标志信号,在每个断裂处都有单拷贝的 CBS 存在,例外的是在 rDNA 分子的 5' 端有三个 CBS 顺序,在 3' 端有一个 CBS 存在^[12,43]。

3.3 小核染色体的删除机制 通过对小核基因组中一段特殊的 9 bp 片段进行详细的分析,发现在这个片段中有三个不连续的部分将在大核形成过程中被删除

掉, 剩余部分的 DNA 重新连接起来, 在营养期中保存下去。这三个被删除部分的长度分别为 1.0 kb, 0.9 kb (或 0.6 kb) 和 2 kb, 因此这三个成分分别位于此片断的右、中、左侧, 故分别被称为右侧成分、中间成分、和左侧成分^[12]。中间成分的删除具有选择性, 删除后可产生 0.9 kb 或 0.6 kb 的片段, 两者产生的机率相同, 这两个片段仅仅是左侧边界不同^[13]。对这些成分的分析揭示出它们具有一些共同的特点, 所有的成分都富含腺嘌呤(A)和胸腺嘧啶(T), 不含有长的开放读码框, 大部分成分的边界处都含有序列和长度不同的短的单向重复序列, 没有发现长的末端重复序列或反向重复序列^[14]。

对中间成分进行深入的研究, 已经发现了一个 10 bp 的序列定位于两个左侧边界以外 45 bp 处, 此序列为 5' AAAAAGGGGG 3', 还发现了一个和此序列互补的 10 bp 序列位于共同的右侧边界以外 45 bp 处, 此序列为 5' CCCCTTATT 3', 这些序列被称为顺式作用顺序, 对于 DNA 的删除起重要作用^[2]。最近的研究发现, 中间删除成分本身对删除也是至关重要的, 删除成分本身的完整性并不是必需的, 但如果用其它的顺序, 如大核基因片断或大肠杆菌质粒 DNA 来取代整个删除成分, 删除则不能发生。因此中间成分, 可能还包括右侧成分的删除, 是被两套顺式作用顺序所控制: 一套是一对于删除成分两侧的调控序列, 确定删除边界, 另一套是内部的增强顺序, 可允许删除过程发生。这可能代表了四膜虫中多种 DNA 删除的调控机制^[14]。

人们推测, 内部的增强顺序有可能通过结合特定的蛋白质来改变 DNA 或染色质的结构, 这种改变了的结构暴露出两侧的调控序列, 从而允许特定的因子结合, 执行删除功能^[14]。最近在四膜虫特定发育阶段的大核胚基内发现了一种特有的蛋白质, 命名为 Pdd1p (programmed DNA degradation 1 protein), 此种蛋白质在营养期细胞和饥饿细胞中不含有, 在发育中的大核胚基内其分布也随不同时期而有变化, 在早期阶段的大核胚基内呈弥散性分布, 后来分布在靠近胚基表面的几个独立区域, 然后从大核胚基中完全消失。通过原位杂交显示出 Pdd1p 和小核所特有的 DNA (将从大核中删除的 DNA) 位于同一位置, 这为 Pdd1p 参与 DNA 删除提供了强有力的证据^[11]。Pdd1p 是在纤毛虫体内发现的第一个和 DNA 删除有关的蛋白质, 此蛋白质是否和顺式作用顺序协同作用, 以及如何起作用的, 尚是有待于解决的问题。

对草履虫 (*Paramecium*) 大核胚基发育过程中内在删除顺序的消除则另有解释。在草履虫中, 内在删除

顺序较短, 长度从 26 bp 到 882 bp 不等, 为富含 AT 的单一序列。在每一单倍体基因组内约有 50 000 多个不同的内在删除顺序。这些顺序的两侧均有 5'-TA-3' 的顺式重复序列, 此外再无其它保守性顺序。在删除发生时, 这样多的不同成分如何被准确地识别并消除, 是一直使人们感到困惑的问题。最近对第四双小核草履虫 (*Paramecium tetraurelia*) 的研究发现, 在大核胚基发育过程中, 老大核基因组能作为模板, 对内在删除顺序的消除起到指导作用, 指导消除准确有效地进行^[3]。

程序性的 DNA 消除是真核生物转录前水平上基因表达调控的重要方式之一, 对细胞的分化起极其重要的作用。对纤毛虫的研究已开始逐步澄清其 DNA 消除的过程以及调控机制, 至于其更为深入的调控机制和这些被删除序列更为详细的情况, 以及小核保持完整基因组的意义, 乃至纤毛虫基因重组过程是如何在进化中逐步形成的, 这些问题尚有待澄清。相信对于这些问题的深入研究, 将为进一步阐明重要的生命现象, 解释细胞行为提供重要的启示和帮助。

参 考 文 献

- [1] Ammermann, D., G. Steinbrück, L. Von Berger *et al.*. The development of the macronucleus in the ciliated protozoan *Stylonychia mytilus*. *Chromosoma*, 1974, **45**: 401~429.
- [2] Austerberry, C. F., M. C. Yao. Sequence structures of two developmentally regulated, alternative DNA deletion junctions in *Tetrahymena thermophila*. *Mol. Cell Biol.*, 1988, **8**(9): 3 947~3 950.
- [3] Duhaucourt, S., A. M. Keller, E. Meyer. Homology-dependent maternal inhibition of developmental excision of internal eliminated sequences in *Paramecium tetraurelia*. *Mol. Cell Biol.*, 1998, **18**(12): 7 075~7 085.
- [4] Kiss, G. B., R. E. Pearlman. Extrachromosomal rDNA of *Tetrahymena thermophila* is not a perfect palindrome. *Gene*, 1981, **13**: 281~287.
- [5] Klobutcher, L. A., M. T. Swanton, P. Donini *et al.*. All gene-sized DNA molecules in four species of hypotrichs have the same terminal sequence and an unusual 3' terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, **78**: 3 015~3 019.
- [6] Klobutcher, L. A., C. L. Jahn, D. M. Prescott. Internal sequences are eliminated from genes during macronuclear development in the ciliated protozoan *Oxytricha Nova*. *Cell*, 1984, **36**: 1 045~1 055.
- [7] Kloetzel, J. A. Compartmentalization of the developing macronucleus following conjugation in *Stylonychia* and

- Euplotes*. *J. Cell Biol.*, 1970, **47**: 395~407.
- [8] Prescott, D. M., A. F. Greslin. The scrambled actin I gene in the micronucleus of *Oxytricha nova*. *Dev. Genet.*, 1992, **13**: 66~74.
- [9] Prescott, D. M. The DNA of ciliated protozoa. *Microbiol. Rev.*, 1994, **58**: 233~267.
- [10] Prescott, D. M. Invention and mystery in Hypotrich DNA. *J. Euk. Microbiol.*, 1998, **45**(6): 575~581.
- [11] Smothers, J. F., M. T. Madireddi, F. D. Warner *et al.* Programmed DNA degradation and nucleolar biogenesis occur in distinct organelles during macronuclear development in *Tetrahymena*. *J. Euk. Microbiol.*, 1997, **44**(2): 79~88.
- [12] Yao, M. C., J. Choi, S. Yokoyama *et al.* DNA elimination in *Tetrahymena*: a developmental process involving extensive breakage and rejoining of DNA at defined sites. *Cell*, 1984, **36**: 433~440.
- [13] Yao, M. C., C. H. Yao, B. Monks. The controlling sequence for site-specific chromosome breakage in *Tetrahymena*. *Cell*, 1990, **63**: 763~772.
- [14] Yao, M. C. Programmed DNA deletions in *Tetrahymena*: mechanisms and implications. *Trends Genet.*, 1996, **12**: 26~30.