

EWA PRZYBOŚ

*Instytut Systematyki i Ewolucji Zwierząt PAN
Stawkowska 17, 31-016 Kraków*

ORZĘSKI JAKO MODELOWE ORGANIZMY W BADANIACH SPECJACYJNYCH, GENETYCZNYCH I BIOLOGII KOMÓRKI

Orzęski (*Ciliophora*, *Protista*) obejmują około 8000 gatunków (CORLISS 1979), pewne ich rodzaje stały się modelowymi eukariotycznymi organizmami w szeroko pojętych badaniach z zakresu genetyki, specjacji i biologii komórki, a to dzięki odkryciu u tych jednokomórkowych organizmów systemu typów koniugacyjnych i uzyskiwanie w sposób planowy i kontrolowany reakcji płciowych, to jest koniugacji i autogamii. Powstały nowe możliwości badań z zastosowaniem tego materiału, pozwoliło to też na poznanie złożonej struktury gatunku w niektórych rodzajach orzęsków.

CHARAKTERYSTYKA ORZĘSKÓW, SPECYFIKA ICH PROCESÓW PŁCIOWYCH

Orzęski występują we wszystkich typach zbiorników wodnych, są kosmopolityczne, mają duże zdolności przystosowawcze, nadto ich hodowla w warunkach laboratoryjnych jest tania, co decyduje o wyborze ich do badań naukowych. Bardzo charakterystyczną cechą orzęsków jest aparat jądrowy, zbudowany z mikrojądra (lub mikrojąder) i makrojądra (lub makrojąder). Jądra te różnią się budową, wielkością i funkcją. Mikrojądro jest głównie jądrem generatywnym, jest zasadniczo diploidalne, uczestniczy w podziale mejotycznym i mitotycznym z udziałem aparatu podziałowego, zbudowanego z mikrotubul. Wykazuje niską transkrypcję lub jej brak. W fazie wegetatywnej życia orzęska odgrywa rolę w stomatogenezie.

Makrojądro jest jądrem wegetatywnym, poliploidalnym, a właściwie poligenomowym, zawiera dużo RNA, metaboliczne DNA, kieruje przemianą materii w komórce. Po podziale poprzecznym osobników wegetatywnych dzieli się amitotycznie. Jest to kombinacja endomitoz i segregacji genomów, nie ma tu wyraźnych chromosomów. Może zawierać podjądra haploidalne lub diploidalne, albo zbiorczy chromosom. W interfazie zawiera elementy chromatynowe i jąderka, jest otoczone podwójną otoczką jądrową.

Charakterystycznym procesem płciowym orzęsków jest koniugacja, osobniki reaktywne reprezentujące uzupełniające się typy koniugacyjne (u.t.k.) łączą się z sobą, następuje rekonstrukcja aparatu jądrowego. Koniugacja zapewnia tworzenie rekombinacji, zwiększa żywotność populacji i daje jej przewagę selekcyjną,

zaczyna też nowy cykl życiowy. Szczegółowe omówienie koniugacji jest w rozdziale dotyczącym cytologii i kariologii orzęsków.

Autogamia jest procesem płciowym zachodzącym w pojedynczym osobniku — zachodzą podziały mejotyczne i mitotyczny mikrojąder i oba pronukleusy zlewają się. Autogamia prowadzi do homozygotyczności.

Od czasu pionierskich badań SONNEBORN z 1937 roku i JENNINGSA z 1938 roku, które ujawniły istnienie systemu typów koniugacyjnych u *Paramecium aurelia* i odpowiednio u *Paramecium bursaria*, system ten opisano też poza rodzajem *Paramecium* między innymi u *Tokophrya*, *Tetrahymena*, *Glaucoma*, *Colpidium*, *Oxytricha*, *Stylonychia*, *Euplotes* (PRZYBOS 1986a).

Okazało się, że taksonomiczne gatunki w obrębie wymienionych rodzajów, są zróżnicowane na szereg genetycznych (biologicznych) gatunków. Osobniki genetycznego gatunku stanowią grupę populacji, między którymi możliwy jest przepływ genów. Genetyczny gatunek stanowi więc pulę genową, wspólną dla szczepów wchodzących w jego skład, jednak izolowaną rozrodczo od innych takich jednostek przez niemożliwość tworzenia żywotnych rekombinacji międzygatunkowych (zgodnie z definicją MAYRA 1963). W obrębie genetycznych gatunków koniugacja zachodzi jedynie między klonami reprezentującymi uzupełniające się typy koniugacyjne (u.t.k.), (SONNEBORN 1957). Klony różnych gatunków w zasadzie nie koniugują ze sobą. Na tej regule jest oparta metoda testów genetycznych, pozwalająca identyfikować gatunki w oparciu o koniugację między u.t.k. szczepów standardowych i badanego szczepu. Bliźniacze gatunki, genetycznie odrębne, są podobne morfologicznie. Różnią się natomiast specyfiką koniugacji, wymaganymi warunkami otoczenia dla uzyskania dojrzałości do koniugacji, cechami biometrycznymi, przebiegiem cyklu życiowego, cechami fizjologicznymi, a zwłaszcza możliwością życia w określonym zakresie temperatur. Z tą ostatnią cechą wiąże się charakterystyczne rozmieszczenie gatunków. Gatunki różnią się typem kojarzenia, krzyżują się bowiem z osobnikami o bliskim lub odległym pokrewieństwie, to jest wykazują „inbreeding” lub „outbreeding”. Ta ostatnia cecha ma zasadnicze znaczenie dla przebiegu specjacji w obrębie poszczególnych gatunków (SONNEBORN 1975).

„Inbreeding” prowadzi do homozygotyczności klonów lub populacji orzęsków. Linie homozygotyczne są znakomitą materiałem do badań genetycznych, ujawniają mutacje po autogamii (SONNEBORN 1950).

„Outbreeding”, polegający na możliwości krzyżowania się klonów o odległym pokrewieństwie, pozwala na ujawnienie się rekombinacji. „Outbreeders” są mniej wyspecjalizowane pod względem wymagań określonych warunków otoczenia, mogą dostosować się do zmian.

„Inbreeding” lub „outbreeding”, przejawiany przez różne gatunki, jest związany z cechującymi je różnymi okresami trwania niedojrzałości i dojrzałości do koniugacji, jak też innymi fazami cyklu życiowego.

Biologiczne (genetyczne) gatunki ujawniają po dwa u.t.k. lub też system wielokrotnych t.k. w gatunku, który powstał przez duplikację dwóch t.k.

PARAMECIUM I TETRAHYMENA JAKO SZCZEGÓLNE MODELE W BADANIACH STRUKTURY GATUNKU I SPECJACJI

Problem specjacji i struktury gatunku jest opracowany najpełniej w rodzajach *Paramecium* i *Tetrahymena*. Problem ten badano różnymi metodami, stosowano analizę genetyczną, cytologiczną, kariologiczną, prowadzono też badania biochemiczne, które wykazały zróżnicowanie gatunków bliźniaczych, jak też molekularne zróżnicowanie szczepów w obrębie gatunków. *Paramecium* i *Tetrahymena* są rodzajami szczególnie dobrze nadającymi się do badania specjacji, nagromadzono bowiem wiele informacji na temat genetyki i struktury gatunków w tych rodzajach.

Obecnie znanych 15 biologicznych gatunków zespołu *Paramecium aurelia* oznacza się w oparciu o koniugację ze szczepami standardowymi (SONNEBORN 1975, AUFDERHEIDE i współaut. 1983) jak wspomniano, lub w oparciu o wzory rozkładu elektroforetycznego enzymów, głównie dehydrogenaz i esteraz (TAIT 1970, ALLEN i GIBSON 1971, ALLEN i współaut. 1973).

Bliźniacze gatunki zespołu *Paramecium aurelia* poprzednio były zwane syngenami (SONNEBORN 1957). Binominalne nazwy gatunkowe (SONNEBORN 1975) otrzymały wtedy, gdy wprowadzono metodę konserwacji żywych standardowych szczepów w płynnym azocie. Opracowano też wówczas alternatywną metodę ich oznaczania w oparciu o wzory elektroforetycznego rozkładu ich enzymów. Nazwy binominalne otrzymały też gatunki (syngeny) *Tetrahymena pyriformis* w 1976 roku (NANNEY i MCCOY), jak również *Euplotes vannus* w 1982 roku (MACHELON). SONNEBORN jednak (1975) uważał, że ostateczną i niezawodną podstawą identyfikacji gatunków zespołu *Paramecium aurelia* pozostaje zdolność do koniugacji ze szczepami standardowymi i powstanie żywotnych, zrekombinowanych klonów F₂.

Zespół gatunków *Tetrahymena pyriformis* jest złożony obecnie z ponad 20 genetycznych gatunków płciowych, posiadających mikrojądra i 5 gatunków bezpłciowych, bezmikrojądrowych. W gatunkach bez mikrojąder można analizować mutacje w makrojądrach. Szczepy takie są odróżniane na podstawie kryteriów biochemicznych (CORLISS i DAGGETT 1983). Poszczególne gatunki są całkowicie genetycznie izolowane między sobą (NANNEY 1982), są jednak podobne morfologicznie, mają też podobne wymagania pokarmowe. Szczepy *Tetrahymena* można hodować akсенicznie bez bakterii w pożywce, co ma wielkie zastosowanie w badaniach dotyczących odżywiania, testach farmakologicznych i innych.

Wszystkie gatunki *Tetrahymena* ujawniają „outbreeding” (SONNEBORN 1957, NYBERG 1974). Prowadzi to do heterozygotyczności lokalnych populacji, homozygotyczność można osiągnąć metodą „genomic exclusion” (wyłączenia części genomu, ALLEN 1967). Uzyskuje się to przez koniugację szczepu a* (z uszkodzonym mikrojądrem) ze szczepem normalnym, powstaje heterokarionidalne potomstwo. Nowe mikrojądro tworzy się przez endoreduplikację haploidalnego, stare makrojądro dalej funkcjonuje, a genotyp uszkodzonego mikrojądra jest eliminowany. Gatunki *Tetrahymena* mają podobną liczbę chromosomów, to jest

$2n = 10$ (RAY 1956), mają też podobną zawartość DNA, od 20 do 50 pg DNA w mikrojądrze w fazie G2 cyklu życiowego (DOERDER i współaut. 1981). Gatunki zespołu *Tetrahymena pyriformis* są jednak silnie zróżnicowane na molekularnym poziomie. Ujawniła to analiza ich kwasów nukleinowych i białek (NANNEY 1982).

Gatunki *Tetrahymena* różnią się procentową zawartością zasad guaniny do cytozyny (od 25% do 33% wg ALLEN i GIBSON 1971). Wykazują różny stopień hybrydyzacji DNA (NANNEY i MCCOY 1976), różnią się wzorami mitochondrialnego i rybosomalnego DNA (NANNEY 1984).

W odniesieniu do białek gatunki zespołu wykazują zróżnicowanie widoczne na przykład przy badaniu rozkładu elektroforetycznego enzymów, lizosomalnych esteraz i kwaśnych fosfataz, a też mitochondrialnych dehydrogenaz (BORDEN i współaut. 1977). Jest on różny dla poszczególnych gatunków, ale też dla szczepów w obrębie jednego gatunku. Również badania antygenów wykazały genetyczny polimorfizm gatunków (CORLISS i DAGGETT 1983). Gatunki *Tetrahymena* różnią się też rodzajem strukturalnych białek tworzących epiplazmatyczny szkielet (WILLIAMS i współaut. 1984), jedynie tubulina jest konserwatywnym białkiem. Rybosomalne białka są też specyficzne gatunkowo, co znajduje zastosowanie w systematyce bezpłciowych gatunków (bez mikrojąder) (PETRIDON i współaut. 1983). Analiza cytometryczna wykazała zróżnicowanie gatunków, cechy mierzalne mogą być użyteczne dla ich oznaczania, jednakże mierzone osobniki muszą być w podobnych fazach cyklu życiowego, to jest w fazie logarytmicznej lub stacjonarnej. Wyniki pomiarów są zależne też od rodzaju pożywki (aksenicznej lub bakteryjnej) zastosowanej w hodowli (TAYLOR i współaut. 1976).

W odniesieniu do problemu powstania poszczególnych gatunków zespołu *Tetrahymena pyriformis* NANNEY (1982) pierwotnie sugerował, że nastąpiło to około 100 milionów lat temu, jednak dane z sekwencjonowania 5S i 5.8S rRNA wykazały brak tak dużych różnic między gatunkami zespołu, radiacja gatunków miała miejsce później (NANNEY 1989). Budowa *Tetrahymena* jest stosunkowo prosta, mógł to być prototypowy orzęsek (NANNEY 1982), obecnie jest rodzajem gwałtownie ulegającym specjacji. O jego starożytności świadczy jego 5S rRNA, zawiera on sekwencje znalezione w bakteriach, nieobecne w cząsteczkach u eukariontów. Histony *Tetrahymena* wykazały różnice w porównaniu z histonami ssaków i roślin, świadczy to też o wczesnym oddzieleniu się orzęsków od głównego pnia eukariontów, przed dywergencją zwierząt i roślin (HAYASHI i współaut. 1984). *Tetrahymena* jest niższym eukariontem, posiada też cechy prokariontów, na przykład dehydrogenaza jabłczanowa (FABREGAT i współaut. 1984) tego gatunku jest bliższa enzymowi izolowanemu z bakterii niż z eukariontów pod względem ciężaru cząsteczkowego i liczby podjednostek. Cytochrom c *Tetrahymena* różni się (TARR i FITCH 1976) od znanych mitochondrialnych cytochromów c eukariontów, jest bardziej podobny do cytochromu c prokariontów. Gatunki *Tetrahymena*, które wykazują tak olbrzymie molekularne zróżnicowanie, są uważane za potomków bardzo starego wspólnego przodka, z którego oddzieliły się poszczególne gatunki. Ich fenotypowy wzór został ustalony jeszcze we wspólnym przodku i pozostał niezmienny, podczas gdy składniki molekularne zostały rozrzucone przez procesy mikroewolucji (NANNEY 1982).

Również bardzo często używanym w badaniach specjacyjnych, genetyce i biologii komórki jest rodzaj *Paramecium*. Taksonomiczne gatunki są zróżnicowane na szereg genetycznych gatunków („sibling species”). Po dwa u.t.k. ujawniają następujące gatunki: zespół *Paramecium aurelia*, *P. calkinsi*, *P. polycaryum* (SONNEBORN 1957) i *P. arcticum* (JANKOWSKI 1962). Wiele t.k. występuje u *P. bur-saria* i *P. trichium (putrinum)* (SONNEBORN 1957). Najczęściej w badaniach doświadczalnych jest używany zespół *P. aurelia*, złożony z 15 gatunków (SONNEBORN 1975, AUFDERHEIDE i współaut. 1983). Ujawniają one „inbreeding”, jednak w różnym stopniu (SONNEBORN 1957), najsilniej *P. tetraurelia*, słabiej *P. biaurelia* (LANDIS 1986), najmniej *P. novaurelia*. Gatunki te przechodzą autogamię w okresie starzenia się klonów (DILLER 1936), która spełnia odmładzającą rolę, jeśli nie występuje zbyt późno w cyklu życiowym klonu (SONNEBORN 1954). Gatunki *P. aurelia* spp. posiadają cykl życiowy zróżnicowany na poszczególne fazy. Opisał już to w XIX wieku Maupas (1889). Według CRIPPA-FRANCESCHI (1987) t.k. w gatunku *P. primaurelia* mają różne tempo wzrostu i względną autonomię. Gatunki zespołu *P. aurelia* są obiektem wielu badań, są bowiem pospolite w przyrodzie, hodowla ich jest tania, poza koniugacją przechodzą autogamię prowadzącą do homozygotyczności linii. Jest to bardzo istotne w badaniach genetycznych czy testowych, ponieważ w potomstwie poautogamicznych linii (homozygotycznych we wszystkich parach alleli) są ujawniane mutacje.

Badania wykonane z użyciem gatunków zespołu *Paramecium aurelia* dotyczą analizy genetycznej prowadzonej na poziomie komórki (są to np. krzyżówki wykazujące pokrewieństwo genetyczne szczepów), czy analizy genotypów prowadzonej na poziomie molekularnym. Badania cytologiczne dotyczą reorganizacji aparatu jądrowego. Badania kariologiczne dotyczą analizy kształtu i liczby chromosomów w mejozie i mitozie. Są też prowadzone na tym materiale badania dotyczące analizy biochemicznej, obejmującej na przykład badania enzymów komórkowych, czy też rozpoznawania komórek przez działanie na ich receptory.

Poszczególne gatunki są płciowo izolowane, reakcje międzygatunkowe nie dają zrekombinowanych żywotnych klonów F₂, mają też różne wymagania warunków otoczenia dla uzyskania dojrzałości do koniugacji (SONNEBORN 1975).

Gatunki zespołu *Paramecium aurelia* ujawniają trzy grupy dziedziczenia t.k. (SONNEBORN 1966). Tak zwana grupa A przejawia karionidalne dziedziczenie, należą tu następujące gatunki: *P. primaurelia*, *P. triaurelia*, *P. pentaurelia*, *P. novaurelia*, *P. undecaurelia*, *P. quadecaurelia*, *P. sonneborni*. Grupa B ujawnia cytoplazmatyczne dziedziczenie t.k. Należą tu: *Paramecium biaurelia*, *P. tetraurelia*, *P. sexaurelia*, *P. septaurelia*, *P. octaurelia*, *P. decaurelia*, *P. dodecaurelia*. Do grupy C należy *P. tredecaurelia*, w którym t.k. są determinowane przez 2 allele w jednym locus.

W gatunkach zespołu występuje też zjawisko „selfingu”, to jest wewnątrzklonalnej koniugacji. W gatunkach *P. pentaurelia* i *P. septaurelia* są również szczepy mające tylko jeden t.k. Na podstawie przejawianych przez gatunki zespołu cech antygenowych można również wyodrębnić dwie grupy gatunków. Symbionty bakteryjne występują głównie w grupie B (SONNEBORN 1957).

Analiza mitochondrialnych genomów gatunków zespołu *Paramecium aurelia* pozwala wyodrębnić dwie grupy gatunków, wcześniej oddzielone w toku ewolucji (CUMMINGS i współaut. 1979). Mitochondrialne DNA wykazuje molekularny

konserwatyzm, a genom ten jest nietypowy dla eukariontów, jest bowiem liniowy zarówno u *Paramecium*, jak i u *Tetrahymena*. Mitochondrialne DNA jest autonomiczne w replikacji i ekspresji. Wykazały to doświadczenia dotyczące oporności na erytromycynę i chloramfenikol, które hamują syntezę białka w bakteryjnych rybosomach. Można przenosić mitochondrialne DNA między pokrewnymi gatunkami, mDNA pochodzący z *Paramecium primaurelia* hybrydyzował z fragmentami mDNA *P. pentaurelia*, wykazywał homologię z fragmentami mDNA *P. tetraurelia*. Możliwość rozwijania się mitochondrialnego DNA w obcym gatunku kontrolują geny jądrowe.

Również analiza rozkładu elektroforetycznego hemoglobiny w gatunkach zespołu *P. aurelia* ujawnia szereg wariantów o różnej ruchliwości (USUKI i IRIE 1983). Podobnie istnieje duża różnorodność pod względem wzoru, liczby, ruchliwości, intensywności prążków determinowanych przez geny makrojądra, w rozkładzie elektroforetycznym mitochondrialnych dehydrogenaz, lizosomalnych esteraz i kwaśnych fosfataz. Istnieją różnice między fenotypem wspólnym dla gatunków a wariantem fenotypu zależnym od allelicznych różnic w pojedynczym locus. Różnice szczepowe wystąpiły głównie w obrębie *Paramecium biaurelia*. Nie ma geograficznego zróżnicowania szczepów pod względem ujawnianych enzymów (ALLEN i współaut. 1983). Prawdopodobnie selekcja działała w kierunku utrzymania dzikiego typu allelu (SONNEBORN 1975). „Inbreeding” w gatunkach zespołu *P. aurelia* prowadzi do zróżnicowania lokalnych populacji, jednak przy zachowaniu podobnej morfologii. Potwierdzają to badania genetyczne (wyniki krzyżówek), badania kariologiczne, badania antygenów. Natomiast lokalne populacje nie są zróżnicowane pod względem cechujących je zymogramów. Gatunki zespołu *P. aurelia* różnią się między sobą długością trwania poszczególnych etapów cyklu życiowego, tempem podziałów, tolerancją temperatur, różnią się promienioczułością. Gatunki zespołu *P. aurelia* wykazują różne preferencje klimatyczne, co wpływa na ich występowanie, mogą więc mieć szerokie lub wąskie rozmieszczenie (PRZYBOŚ 1993, PRZYBOŚ i KOMALA 1993). Gatunki cechuje brak cyst, ma to wpływ na ich rozprzestrzenianie. Różnią się też wymiarami komórek, jednak podobne wymiary mają *P. primaurelia* i *P. pentaurelia*. Cechuje gatunki różna liczba chromosomów, jednak nie ma jednolitości w obrębie gatunku pod tym względem (SONNEBORN 1975).

W obrębie zespołu *P. aurelia* są wyodrębnione co najmniej dwie grupy gatunków, system charakterystyczny dla grupy B dziedziczenia typów koniugacyjnych wydaje się starszy, występuje też w innych taksonomicznych gatunkach, jak *P. multimicronucleatum*, *P. caudatum* i *P. jenningsi*. Podobnie „outbreeding” występował też prawdopodobnie u przodków „inbreeders”. Według SONNEBORNA (1957) powiązania ewolucyjne gatunków zespołu *P. aurelia* w oparciu o analizę typów koniugacyjnych przedstawiają się następująco: w obrębie gatunków grupy A z *P. primaurelia* powstały gatunki: *P. triaurelia*, *P. pentaurelia*, *P. septaurelia*, *P. novaurelia* i *P. undecaurelia*. W obrębie grupy B z *P. biaurelia* powstały: *P. tetraurelia* i *P. sexaurelia*; z *P. tetraurelia* powstały: *P. octaurelia*, *P. decaurelia* i *P. dodecaurelia*. Na podstawie analizy powiązań lizosomalnych esteraz (ALLEN i współaut. 1982) gatunków zespołu można odtworzyć ich ewolucyjne powiązania. Odrębnie grupuje się *P. tetraurelia*, z którego powstał *P. octaurelia*, osobno *P. biaurelia* i odrębnie *P. primaurelia*.

PROBLEM STARZENIA SIĘ I DŁUGOŚCI TRWANIA ŻYCIA KLONU

Problem starzenia i długości trwania życia klonu jest różny w odrębnych gatunkach zespołu *P. aurelia*. Starzenie się jest związane z ograniczeniem wzrostu (podziałów), następuje akumulacja toksyn, niszczenie niedzielących się komórek. *Paramecium* nie jest nieśmiertelne, w okresie starości pantofelki przechodzą autogamię, bez niej tracą zdolność do podziałów po upływie 250 do 300 pokoleń komórek (SONNEBORN 1954). Następuje somatyczne starzenie, maleje też całkowita ilość DNA na komórkę (SMITH-SONNEBORN 1979). „Inbreeders” mają krótszy okres trwania życia klonu, „outbreeders” długi. Można przedłużyć życie klonu przez zwiększenie aktywności enzymów reperujących DNA. Poza somatycznym starzeniem jest też genetyczne starzenie, ma miejsce utrata zdolności dawania żywotnego potomstwa po koniugacji. Można zastosować zewnętrzne bodźcowe działanie, starą komórkę przenieść do świeżej pożywki. Następuje początkowo zwłoka w podziale, potem faza eksponencjalna. Wyczerpana pożywka powoduje obniżenie dziennego tempa podziałów (AUFDERHEIDE 1987).

PROCESY PŁCIOWE ORZĘSKÓW

Organizmem modelowym w biologii doświadczalnej jest również *Blepharisma* sp. używany w badaniach płciowych reakcji między komórkami. Stwierdzono w organizmach feromony, substancje umożliwiające stymulację partnerów koniugacji w odrębne typy koniugacyjne (MIYAKE i BEYER 1973, 1974). Przeprowadzono analizę chemiczną i molekularną tych substancji, zbadano ich oddziaływanie na receptory, sposób ich genetycznej determinacji. Innym rodzajem, będącym obiektem badań z uwagi na posiadanie feromonów, jest *Euplotes* sp. cechujący się systemem wielokrotnych typów koniugacyjnych w gatunku. Interesujące jest, że feromony występują u *Euplotes raikovi* i *E. octocarinatus* nie występują u *E. crassus* (ROSATI i VERNI 1991).

Interesującym zagadnieniem jest koordynacja zjawisk płciowych u orzęsków. Sygnały dla osobników reprezentujących u.t.k. występują na rzęskach u *Paramecium* i *Tetrahymena*, ale mogą występować też w otoczeniu jako feromony u *Euplotes* i *Blepharisma*. Ich wymiana jest konieczna dla wystąpienia reakcji płciowych (WOLFE 1993).

Reakcje płciowe występujące u orzęsków można nazwać za NANNY (1980) „cytoplazmatycznymi manewrami”. Koniugacja została opisana u *Paramecium* już w 1786 roku przez O.F. Müllera, potem badali ten proces w XIX wieku Hertwig i Maupas. Rolą koniugacji jest zwiększenie zmienności, odmładzanie populacji przez reorganizację aparatu jądrowego. Stare makrojądro ulegające rozpadowi akumuluje bowiem zmutowane geny. Koniugacja składa się z szeregu etapów, reaktywne osobniki reprezentujące u.t.k. łączą się ze sobą. Mikrojądro przechodzi zwykle 3 podziały przedgamiczne (2 mejotyczne i 1 mitotyczny). W 3 podziale przedgamicznym (mitotycznym) uczestniczy tylko 1 mikrojądro z obszaru blisko

aparatu gębowego. W wyniku tego podziału powstają pronukleusy, wędrujący, posiadający mikrotubule i stacjonarny. Następuje wymiana wędrujących pronukleusów między partnerami koniugacji. Istotna jest tu obecność białka „fenestrin” zlokalizowanego pod epiplazmą i służącego do przejścia i z kolei zakotwiczenia stacjonarnego pronukleusa w rejonie połączenia (NELSEN i współaut. 1994) partnerów koniugacji. Pośrednie białko filamentowe („intermediate filament protein”) u *Tetrahymena* przypomina białko występujące u ssaków, odgrywa ono rolę w morfogenezie aparatu gębowego przed podziałem poprzecznym komórki, bierze udział w przemianach jąder w koniugacji. Uczestniczy więc ono w powstaniu haploidalnych jąder po podziałach mejotycznych, selekcji jednego z 4 jąder do dalszego podziału i powstania pronukleusów, przeniesieniu wędrującego pronukleusa przez połączenie międzykomórkowe i tworzeniu synkarionu przez zlanie się pronukleusów (NUMATA i współaut. 1985, 1991, TAKAGI i współaut. 1991). Kolejnym etapem jest kariogamia, w wyniku której powstaje synkarion — diploidalne jądro. Następują, z kolei, podziały pozygotyczne synkarionu, różnicowanie jąder na mikrojądra i makrojądra (przez stadium zawiązków makrojąder). Liczba powstających zawiązków jest zmienna, może być cechą diagnostyczną. Różnicowanie się jąder pozostaje pod wpływem cytoplazmy, zależnie od usytuowania się jąder w przedniej lub tylnej części komórki (AUFDERHEIDE i współaut. 1993). Stare makrojądro ulega rozpadowi w gatunkach rodzaju *Paramecium*, wyjątkiem jest gatunek *P. bursaria*, w którym nie ma rozpadu.

Profaza pierwszego podziału mejotycznego jest charakterystyczna dla orzęsków, według BĚLÁR (1926) jest pierwotnym typem mejozy. Profaza może występować w formie stadium półksiężyca, na przykład u *Paramecium aurelia* spp. lub jako stadium spadochronowe u wielu rodzajów orzęsków. Stadia te odpowiadają zygotenowi (z biwalentami) i pachytenowi (z tetradami chromosomowymi). W kolejnym stadium — diakinezie ma miejsce skracanie się mikrojądra. Wcześniej, mikrojądro odsuwa się od makrojądra, powiększa, staje się słabo wybarwione, przechodzi w profazę. Mejoza orzęsków odpowiada zasadniczo klasycznemu schematowi, w jej wyniku powstają jądra gametyczne, a ilość DNA odpowiada stosunkowi liczbowemu 4:2:1. Chromosomy są widoczne jako biwalenty w profazie lub tetrazy w metafazie mejozy. W profazie można obserwować kompleksy synaptonemalne z chiazmami (PRZYBOŚ 1986b).

U *Tetrahymena pyriformis* w pachytenie i wczesnym diplotenie profazy występuje 5 par biwalentów, które znajdują się w równiku komórki w stadium metafazy (TIEDTKE 1982).

U wielu gatunków *Paramecium* badano chromosomy. U *P. bursaria* obserwowano polimorfizm mikrojąder i ich poliploidalność w profazie mejozy I. Poliploidalność obserwowano też u *P. polycaryum*, *P. aurelia* spp., *P. multimicronucleatum*, *P. caudatum*. U *P. aurelia* spp. już w 1936 roku DILLER obserwował w trakcie mejozy w autogamii 30 do 40 chromosomów. W gatunku *P. tetraurelia* DIPPELL (1954) określiła w różnych szczepach $n = 33\text{--}51$ chromosomów. KOŚCIUSZKO (1965) badała chromosomy u *P. primaurelia*, a JONES (1956) poza tym gatunkiem też w innych gatunkach zespołu *P. aurelia*. W szczepie 324 *P. triaurelia* (PRZYBOŚ i współaut. 1979) obserwowano $2n = 160$.

Ze względu na ogromną zmienność zjawisk orzęski mogą być obiektem badania ewolucji mitozy, mejozy, poliploidyzacji, politenizacji chromosomów.

Jest interesujące, że podziały mikrojąder odbywają się z zachowaniem otoczki jądrowej, wewnątrzjądrowo.

Innym procesem płciowym, poza koniugacją, jest autogamia, rekonstrukcja aparatu jądrowego zachodzi w pojedynczym osobniku. Cytogamia jest autogamią występującą u partnerów koniugacji. W trakcie regeneracji makrojądra jest ono odtwarzane z fragmentów starego.

Specyficznie przebiega rozwój makrojądra u *Hypotrichida*. Po wymianie pronukleusów i utworzeniu synkarionu w trakcie rozwoju zawiązków makrojąder powstają chromosomy politeniczne, potem następuje eliminacja dużej części chromatyny z makrojądra i druga poliploidyzacja. Dojrzałe makrojądro zawiera wolne geny, są one właściwie fragmentami chromosomów o długości paru genów. W mikrojądrze też następuje amplifikacja i przegrupowanie większych sekwencji genomu (PRESCOTT 1994). Mikrojądro może być pęcherzykowate z endosomem (u *P. aurelia* spp., *P. multimicronucleatum*, *P. jenningsi*) lub zbite (u *P. bursaria* czy *P. caudatum*). Mikrojądra zbite wykazują duży polimorfizm i poliploidię.

Oba jądra, jak zaznaczono, są różne funkcjonalnie i strukturalnie. W makrojąrze można też obserwować wyrzucanie pewnej ilości chromatyny („chromatin exclusion”) w celu regulacji ilości DNA (BODENBENDER i współaut. 1992). Może mieć miejsce amplifikacja genomu, szczególnie sekwencji kodujących rRNA. Te ostatnie sekwencje występują jako izolowane, wolne palindromy. Nie ulega amplifikacji tRNA i 5SrRNA (YAO i współaut. 1978). U *Tetrahymena thermophila* w makrojądrze ma miejsce fenotypowe sortowanie 45 tworzących je losowo wybranych elementów. Ujawnia się to w heterozygotach, takie klonny z dominującym allelem początkowo ujawniają go, potem dają podlinie z recesywnym allelem (NANNEY 1963, 1980). Zawartość DNA w makrojądrze jest ekwiwalentem 45 haploidalnych układów.

U orzęsków, jak wspomniano, istnieje też proces koniugacji w obrębie klonu zwany „selfingiem”. Mechanizm tego procesu jest inny u *Paramecium* i u *Tetrahymena*. U *Paramecium* polega on na zmianie kontroli transkrypcji w stadium wegetatywnym oraz ma miejsce międzyalleliczna represja, to jest represja i odblokowanie allelu. Natomiast u *Tetrahymena* zachodzi swobodne sortowanie alleli w trakcie podziału, „selfing” występuje przed ukończeniem sortowania alleli (NANNEY 1980).

Aparat podziałowy orzęsków jest bardzo charakterystyczny, podział zachodzi z zachowaniem otoczki jądrowej, jest to podział acentryczny. Otoczka jądrowa może być centrum organizacyjnym dla mikrotubul, ma miejsce kontrola ich liczby, orientacji, ułożenia przestrzennego i biegunowości. Natomiast centrosomy mogą być rozproszone (holocentryczne), a ich budowa ujawnia ewolucyjne powiązania orzęsków. Na przykład *Paramecium bursaria* nie ma typowych centrosomów, występują mikropłytki, mikrowłókna, mikrotubule. *P. multimicronucleatum* ma rozproszone centromery, *P. aurelia* spp. ma centrosomy wyraźne lub rozproszone (RAIKOV 1978).

Badania cytologiczne i kariologiczne mogą wyjaśnić ewolucyjne powiązania orzęsków i ich filogenezę. Można wyodrębnić parę etapów ewolucji. Początkowo miało miejsce przekształcenie makrojądra od poziomu diploidalnego do poliploidalnego, potem nastąpiło zróżnicowanie kariologiczne i genetyczne szczepów w obrębie biologicznych gatunków *Paramecium aurelia* spp. przez aberracje

chromosomów w mikrojądrach (translokacje, duplikacje). Zróżnicowanie to zostało utrwalone w populacjach „inbreeders” przez autogamię. Występuje więc różna zawartość eu- i heterochromatyny, większa u „inbreeders”, mniejsza u „outbreeders”. Ewolucja przebiegała w oparciu o poliploidy u *P. caudatum*, *P. bursaria*, *P. putrinum*, *P. jenningsi* lub aneuploidy u *P. aurelia* spp. (PRZYBÓŚ 1986 b).

DZIEDZICZENIE CYTOPLAZMATYCZNE

Innym zagadnieniem badanym u orzęsków jest problem dziedziczenia cytoplazmatycznego. Klasycznymi przykładami były: zabijanie szczepów wrażliwych, typy antygenowe, typy koniugacyjne. Okazało się, że tymi zjawiskami kierują geny jądrowe, a tak zwane szczepy zabijające „killers” mają symbionty bakteryjne. Cecha zabijania ujawniana przez „killers” jest związana z ginieciem szczepów wrażliwych pod wpływem toksycznego oddziaływania szczepów zawierających bakteryjne endosymbionty, głównie z rodzaju *Caedobacter*, występujące u *Paramecium* w cytoplazmie, mikrojądrze lub makrojądrze (GORTZ 1988, QUACKENBUSH 1988).

Interesującym zagadnieniem są tak zwane „corticogenes”. U orzęsków występuje genetyczna specjalizacja rejonów powierzchni komórki oparta na przestrzennej informacji, jest to wynik poprzedniego zróżnicowania funkcji. Organizacja powierzchni „corteksu” wykazuje tendencję do powielania się. Organizmy używają struktur poprzednio istniejących jako rusztowań w procesie wzrostu (BEISSON i RUIZ 1992).

W „corteksie” nie ma jednak DNA, a RNA jest związane z ciałkami podstawowymi. Część informacji może być zakodowana w układach metabolicznych i agregatach wielkocząsteczkowych (IFTODE i współaut. 1989). SONNEBORN i DIPPELL (1960) opisali u *P. aurelia* spp. mutanty struktur kortikalnych, w których te zmutowane cechy utrzymywały się i były dziedziczone mimo identycznego genotypu partnerów po koniugacji, czy karionid po autogamii. Na przykład po koniugacji osobnika podwójnego (dublet) z osobnikiem normalnym (pojedynczym) — z podwójnego zawsze powstaje podwójny, a z pojedynczego pojedynczy w F₁, cecha ta utrzymuje się też w F₂ uzyskanym drogą autogamii. Struktury powierzchniowe są więc trwałe, nowe powstają pod kontrolą poprzednio istniejących („cytotaksja” — termin Sonneborna). Ciałka podstawowe są homologiczne z centriolami, nowe powstają w ścisłym związku z poprzednio istniejącymi (NANNEY 1975). Stara struktura jest źródłem architektonicznej informacji (HYVER i LE GUYADER 1995). Powierzchnia komórki kontroluje podział ciałek podstawowych, makrojądra i komórki (DE TERRA 1974). Być może synteza DNA w makrojądrze może być kontrolowana przez informację z „corteksu” napływającą do jądra przez system kanałów reticulum endoplazmatycznego. Powierzchnia łączy mechanizmy rozprzestrzeniające zmianę strukturalną. Nowe badania (CURTENAZ i współaut. 1994) wykonane z zastosowaniem techniki przeciwciał monoklonalnych wykazały, że epiplazma (czyli szkielet błonowy leżący pod błoną kortikalną) u różnych gatunków orzęsków wykazuje różnorodność w odniesieniu do rozmiaru i liczby białek szkieletowych. Epiplazma jest odpowiedzialna za

utrzymanie kształtu komórki, określenie ułożenia ciałek podstawowych i zaktwiczenie mikrotubul w korteksie (CURTENAZ i współaut. 1994).

Innym zagadnieniem jest tak zwane obopólne wykluczanie („mutual exclusion”) przejawiane przez system determinujący antygeny powierzchniowe (unie ruchamiające) u *Paramecium*. U *P. primaurelia* antygeny działają w określonej temperaturze od 10°C do 40°C, odpowiednio ujawniają się antygeny S, G, D. Są determinowane przez szereg niesprzężonych loci, powiązanych w system wzajemnego wykluczania. Orzęski przystosowują się do zmian otoczenia przez zmianę swojej aktywności. W określonej temperaturze jest syntetyzowane odpowiednie białko antygenowe (BEALE 1954).

W determinowaniu cech u orzęsków ujawnia się też współdziałanie jądrowo-cytoplazmatyczne, widoczne w różnicowaniu makrojądra czy losowej determinacji karionid. W zależności od lokalizacji w komórce produktów podziału synkarionu (diploidalnego jądra powstałego po zlaniu się pronukleusa stacjonarnego z wymienionym od partnera pronukleusem wędrującym) przekształcają się one w mikrojądro lub w makrojądro. Typy koniugacyjne są determinowane przez makrojądro w karionidach (produktach pierwszego podziału komórkowego byłego partnera koniugacji). Istotną rolę odgrywa temperatura — w niższej częstsze są typy nieparzyste. Determinacja typów koniugacyjnych jest wyborem dwóch stanów jądrowych. Wybór może pozostawać pod wpływem temperatury otoczenia. Stan wybrany jest potem powielany przez linie karionid. Determinacja karionid może być skoordynowana. Takim przykładem jest determinacja t.k. u *Paramecium tetraurelia* i w tak zwanej grupie B zespołu *P. aurelia*. Istotną rolę odgrywa tu cytoplazma kontrolowana przez stare makrojądro, jeszcze nie uległe rozpadowi, istniejące w cytoplazmie, jednakże w której już jest nowe makrojądro (BUTZEL 1974). W podobny sposób odbywa się dziedziczenie cechy wyrzucania lub nie wyrzucania trichocyst w grupie B zespołu *P. aurelia* (NYBERG 1978).

BADANIA BIOCHEMICZNE I FIZJOLOGICZNE

U orzęsków, zwłaszcza u *Paramecium* i *Tetrahymena*, można badać podstawy genetyczne wielu istotnych zjawisk zachodzących u eukariontów związanych z cyklem komórkowym. Istotne jest, na przykład, poznanie drogi przekazywania sygnałów z receptorów do wnętrza komórki. Insulina powoduje aktywację i skupianie cGMP i cAMP na rząskach i koło błony komórkowej u *Tetrahymena*. Poprzednia ekspozycja na hormon zwiększa zdolność jego wiązania (KOVÁCS i CSABA 1994). Po zetknięciu się komórki z hormonem ma miejsce długotrwała zmiana w błonowych receptorach; następuje zmiana płynności. *Tetrahymena* ma więc struktury podobne do receptorów hormonalnych występujących w błonach komórkowych wyższych kręgowców.

Tetrahymena może być modelem w wielu badaniach biologicznych, organizm ten można hodować na pożywkach o określonym składzie chemicznym (WHEATLEY i współaut. 1994), do których można dodawać różne badane substancje, na przykład substancje powodujące proliferację wzrostu, substancje toksyczne. Organizm ten jest więc używany w badaniach dotyczących wzrostu, regulacji cyklu komórkowego, odżywiania. *Tetrahymena* może być organizmem służącym

do testowania skażenia środowiska. Może też być użyta w różnych biotechnologiach, na przykład do produkcji enzymów hydrolitycznych, wydzielanych potem do pożywki. Jest też organizmem testowym do badania leków, na przykład używanych w leczeniu raka u ludzi, podobnie jak antybiotyk adriamycyna (SOOSE i współaut. 1994). Co ciekawe, *Tetrahymena* może rozpoznawać substancje o stężeniach niższych niż te, które są efektywne u glonów przy badaniu hamowania wzrostu (PAULI i współaut. 1994). Podobnie *Paramecium* jest bardzo wartościowym organizmem eukariotycznym służącym jako model do badania chemicznych substancji czy adaptacji na nie (HENNESSEY i współaut. 1994). Na przykład *Paramecium primaurelia* z zepołu *P. aurelia* ma zastosowanie jako organizm testowy w badaniach pestycydów, czy wpływu skażenia środowiska (KOMALA 1992, 1994). *Paramecium caudatum* było na przykład modelem działania niedotlenienia na organizmy eukariotyczne (MALVIN i Wood 1992). Zwykle niedotlenienie powoduje przemieszczanie się zwierząt wielokomórkowych w zimniejsze strefy (hypotermia). Również *P. caudatum* wybiera niższą temperaturę w takich warunkach, co jest istotne dla przeżycia. *P. caudatum* może być więc modelem w badaniach dotyczących adaptacji termoregulacyjnych, prowadzonych na poziomie komórki i na poziomie molekularnym.

INŻYNIERIA GENETYCZNA U ORZĘSKÓW

Szereg problemów inżynierii genetycznej może być badanych z zastosowaniem orzęsków. W pewnym sensie inżynierię genetyczną *in vivo* u *Tetrahymena* prowadzili BRUNS i współpracownicy (1982), wykorzystując możliwość konstruowania homozygotycznych linii tych organizmów poprzez genomowe wyłączenie.

Można tworzyć szczepy nullisomiczne z wyeliminowanymi chromosomami z mikrojądra z brakującą kopią jednego lub więcej chromosomów. Tak uzyskane szczepy umożliwiają mapowanie genów w chromosomach. Jeśli skrzyżuje się nullisomicznego osobnika z diploidalnym, powstanie osobnik monosomiczny. Jeżeli mapowany gen znajduje się na brakującym chromosomie w organizmie nullisomicznym, to potomstwo będzie miało jedną kopię genu (będzie hemizygotyczne) i ujawni zmutowany fenotyp. Jeśli badany gen jest na chromosomie obecnym w organizmie nullisomicznym, to potomstwo będzie miało kopię genu od każdego z rodziców, będzie heterozygotyczne i początkowo ujawni dominujący fenotyp. Jeśli mapowana mutacja jest dominująca, wtedy homozygota i heterozygota będą miały początkowo ten sam fenotyp. *Tetrahymena* przechodzi fenotypowe sortowanie, a więc w wegetatywnym potomstwie heterozygot ujawni się fenotyp jednego z rodziców. Heterozygoty będą sortować linie ujawniające recesywny fenotyp.

Przykładem inżynierii genetycznej jest proces dojrzewania makrojąder u orzęsków. W dojrzałym makrojądrze u *Hypotrichida* występują cząsteczki DNA o wymiarach genów, po uprzednich przemianach polegających na fragmentacji chromosomów, eliminacji z nich większości, to jest około 95% DNA, dodaniu telomerów z powtórkami C4A4 i G4T4 (PRESCOTT 1993). Chromosomy o wymiarach genów przechodzą liczne replikacje, na przykład u *Oxytricha nova* występuje 1000 kopii 2000 różnych genów. Makrojądro *Paramecium* czy *Tetrahymena*

przechodzi mniejsze zmiany w trakcie swego rozwoju, jednak mają miejsce wycięcia i przyłączania sekwencji, dodawanie telomerów z charakterystycznymi powtórkami (C4A2 i G4T2), które są dodawane kolejno w niematrycowy sposób (GALL 1984).

Zainteresowanie budzą problemy tasowania DNA, struktury telomerów, czy też samoskładania pre rRNA u *Tetrahymena thermophila*. Ten ostatni problem zostanie tu omówiony. Geny u orzęsków są, jak wiadomo, podzielone na egzony i introny, podobnie jak u innych *Eukariota*, zarówno w jądrach, mitochondriach (jednakże tylko na mRNA, rRNA, nie na tRNA) i w chloroplastach (tu na mRNA, rRNA i tRNA). Sensacyjne odkrycie CECH'A (1987) ujawniło, że składanie, to jest wycinanie intronów *in vivo* zachodzi bez udziału białek enzymatycznych i źródła energii z zewnątrz. Funkcję enzymu pełni intron, reszta guanozyny jest przyłączana do granic egzonu\intronu. Z kolei, intron jest uwalniany jako kłosa cząsteczka a egzony są połączone. Następuje seria transestryfikacji, dzięki czemu nie jest potrzebna energia z zewnątrz (np. z ATP). Guanozyna spełnia rolę akceptora fosforanu w pierwszej transestryfikacji. Intron jest centrum katalitycznym, jego aktywność jest powodowana II i III rzędową strukturą (McCONNELL i współaut. 1993). Cząsteczki RNA działające jak enzymy zostały nazwane rybozymami (BARINAGA 1993), mogą niszczyć rRNA, na przykład wirusa HIV.

U *Tetrahymena thermophila* locus rRNA w mikrojądrze o długości 10,3 kb przechodzi dramatyczny proces podczas przekształcania w makrojądro. Jest cięty na 200 odcinków, do których dodawane są telomery; sekwencje flankujące i wewnętrzne są wycinane. Następuje zwielokrotnianie do 10 000 kopii (KAPLER 1993), które mają formę palindromów. Dodawanie telomerów ma też miejsce u *Paramecium*, badano to metodą mikroiniekcji (GILLEY i współaut. 1988). Telomery są kompleksami niejąderekowymi, złożonymi z białka i DNA, stabilizują końce chromosomów. Chromosomy makrojądra segregują losowo w czasie wegetatywnego wzrostu, mają u *Tetrahymena* ploidalność 45°C. Chromosom na rRNA (17S, 5,8S, 26S) jest dalej zwielokrotniany.

Interesujące jest, że kodony orzęsków są nieco inaczej używane niż u innych *Eukariota*. *Paramecium*, *Tetrahymena*, *Stylonychia* i *Oxytricha* używają dla translacji glutaminy kodonów UAA i UAG będących uniwersalnymi kodonami stop. Jako jedyne kodonu stop używają UGA. Ten ostatni kodon jest używany przez *Euplotes* do kodowania cysteiny. Z kolei, *Blepharisma* i *Euplotes* używają UAA jako kodonu stop. Być może, te różnice mogą odzwierciedlać ewolucyjne powiązania orzęsków. Rodzaj *Blepharisma* mógł być wcześniej oddzielony od *Hypotrichida*, są też różnice między *Euplotes*, *Stylonychia* i *Oxytricha*. Kodon UAA, oznaczający stop u *Euplotes* i *Blepharisma*, niezwykle używany u innych orzęsków, ewoluował po oddzieleniu się orzęsków od głównej linii *Eukariota* (LIANG i HECKMANN 1993).

Problemem, który może być badany na *Tetrahymena*, jest regulacja działania genów u *Eukariota*. Można badać fosforylację histonu H1 (LU i współaut. 1994) w okresie syntezy DNA w mitozie, bowiem wzrasta poziom fosforylacji (katalizowanej przez konserwatywną kinazę MPF); po ukończeniu mitozy następuje defosforylacja. Fosforylacja histonu H1 powoduje dekondensację chromosomów, aktywację genów i replikację DNA. U *Paramecium* można też badać regulację poszczególnych faz cyklu życiowego, na przykład wpływ cytoplazmy przeszczep-

pianej techniką mikroiniekcji na długość trwania okresu niedojrzałości do autogamii (KOŚCIUSZKO i PRAJER 1990).

Orzęsków można używać do tworzenia transgenicznych organizmów, powstałych przez przenoszenie DNA i mRNA na różnych poziomach, *Prokariota-Eukariota*, *Eukariota* niższe i wyższe. Uzyskano ekspresję genu oporności na antybiotyki, pochodzącego z *Escherichia coli* w makrojądrze *Stylonychia* (MEYERS i HELFTENBEIN 1988). Wektorem był liniowy plazmid z genem oporności na neomycynę z *E. coli*, pozostający pod kontrolą promotora genu aktywny z *Dictyostelium discoideum*, powiązany z fragmentami amplifikowanego makrojądrowego DNA *Stylonychia*. U bakterii *E. coli* uległ ekspresji gen *Paramecium* kodujący kalmodulinę (białko wiążące jony wapnia) po czterech zmianach TAA na CAA poprzez serię PCR (KINK i współaut. 1991). Zmieniono kodon TAA — u większości orzęsków kodujący glutaminę — na kodon CAA, kodujący kalmodulinę.

Ze względu na inny sposób używania uniwersalnych kodonów stop u orzęsków, to jest UAA i UAG do kodowania glutaminy, geny orzęsków nie mogą być ujawnione w heterologicznych organizmach, takich jak *E. coli*. Dla pokonania tej bariery opracowano system supresji do czytania kodonów UAA i UAG, mianowicie silny supresor tRNA do UAA. Ta metoda otwiera drogę do klonowania genów orzęsków i dla ekspresji poszczególnych sekwencji (COHEN i współaut. 1990).

Podobnie u *E. coli* klonowano plazmid z DNA cząstek kappa (*Caedibacter* sp.), odcinek kodujący R ciała (do reprodukcji); uzyskano translację 3 białek kodowanych przez nie (QUACKENBUSH 1988).

Fragmenty DNA bakteriofaga replikują się w makrojądrze *Paramecium* po mikroiniekcji jako liniowe cząsteczki. Są one substratami do przedłużania telomerów *Paramecium* przez endogenną telomerazę. Wszczepione DNA jest replikowane raz w ciągu podziału komórki. Jest to system przeciwdziałania powtórnej replikacji. Może taki jest mechanizm regulowania ilości DNA w makrojądrze, to jest liczby kopii, których u *Paramecium* jest 1000 do 15000 każdego genu pochodzącego z diploidalnych kopii obecnych w mikrojądrze (KIM i współaut. 1992).

Dokonano również transformacji *Tetrahymena* genem rRNA oporności na cykloheksimid (YAO i YAO 1991) pochodzącym z drożdży. Transformacja zachodzi przez specyficzne zastąpienie sekwencji gospodarza, ale nie wszystkich kopii genu w poliploidalnym makrojądrowym genomie. Wszczepione zmutowane geny mogą służyć jako dominujące markery transformacji w tym organizmie.

Innym przykładem jest wprowadzenie mRNA z *Paramecium* determinującego antygeny powierzchniowe do oocytów *Xenopus* metodą mikroiniekcji. Uzyskano w oocytach translację białek antygenowych (SOMMERVILLE 1983).

Orzęski jako eukarionty o poznanych częściowo genotypach mogą być stosowane w wielu jeszcze innych dziedzinach zoologii doświadczalnej jako organizmy modelowe obok szeregu innych organizmów (*Drosophila*, drożdże i inne). Wydaje się celowe przybliżenie tych możliwości.

CILIATES AS MODEL ORGANISMS IN THE STUDIES ON SPECIATION, GENETICS AND CELL BIOLOGY

Summary

The discovery of the system of mating types in some ciliate genera (e. g. *Tetrahymena*, *Paramecium*, *Oxytricha*, *Stylonychia*, *Euplotes*) initiated and stimulated rapid development of protozoan genetics, especially in the genera *Paramecium* and *Tetrahymena*. The latter two can be used as model eukaryote organisms in genetic, cytological, karyological and biochemical analysis as well as in genetic engineering and in studies on speciation. Both organisms are also used in testing toxic substances, thus they are useful for medicine and for evaluation of environmental pollution. *Tetrahymena* is also applied in different biotechnological procedures. It is worth mentioning that the organism can be cultivated on a large scale to suit laboratory or commercial purpose. Work on the ciliates (mainly *Paramecium* and *Tetrahymena*) has extended our understanding of different problems, such as structure of species, different aspects of growth, cell cycle control, cytokinesis, intercellular signalling, and, particularly in the work on *Tetrahymena*, the problem of self splicing of mRNA.

LITERATURA

- ALLEN S. L., 1967. *Cytogenetics of genomic exclusion in Tetrahymena*. Genetics 55, 797-882.
- ALLEN S. L., BYRNE B. C., CRONKITE D. L., 1971. *Intersyngentic variation in the esterases of bacterized Paramecium aurelia*. Biochem. Genet. 5, 135-150.
- ALLEN S. L., GIBSON J., 1971. *The purification of DNA from the genomes of Paramecium aurelia and Tetrahymena pyriformis*. J. Protozool. 18, 518-525.
- ALLEN S. L., FARROW S. W., GOLEMBIEWSKI P. A., 1973. *Esterases variations between the 14 syngens of Paramecium aurelia under axenic growth*. Genetics 73, 561-573.
- ALLEN S. L., NERAD T. A., RUSHFORD C. L., 1983. *Comparison of the esterases and acid phosphatases in Paramecium multimicronucleatum, syngens 1-5, Paramecium jenningsi, Paramecium caudatum, and the Paramecium aurelia complex*. J. Protozool. 30, 148-154.
- ALLEN S. L., LAU E. T., NERAD T. A., RUSHFORD C. L., 1982. *Esterase variants in four species of the Paramecium aurelia complex*. J. Protozool. 29, 604-611.
- AUFDERHEIDE K. J., 1987. *Clonal aging in Paramecium tetraurelia. II. Evidence of functional changes in the macronucleus with age*. Mech. Aging Dev. 28, 57-66.
- AUFDERHEIDE K. J., DAGGETT P.-M., NERAD T. A., 1983. *Paramecium sonneborni n. sp., a new member of the Paramecium aurelia species-complex*. J. Protozool. 30, 128-131.
- AUFDERHEIDE K. J., DU K., FRY E. S., 1993. *Directed positioning of micronuclei in Paramecium tetraurelia with laser tweezers: absence of detectible damage after manipulation*. J. Euk. Microbiol. 40, 793-796.
- BARINAGA M., 1993. *Ribozymes: killing the messenger*. Science 262, 1512-1514.
- BEALE G. H., 1954. *Genetics of Paramecium aurelia*. Cambridge University Press, Cambridge.
- BEISSON J., RUIZ F., 1992. *Lithium-induced respecification of pattern in Paramecium*. Developmental Genetics 13, 194-202.
- BÊLÂR K., 1926. *Der Formwechsel der Protistenterne*. Ergebnisse und Fortschritte der Zoologie 26, 235-654.
- BODENBENDER J., PROHASKA A., JAUKE F., HIPKE H., CLEFFMANN G., 1992. *DNA elimination and its relation to quantities in the macronucleus of Tetrahymena*. Developmental Genetics 13, 103-110.
- BORDEN D., MILLER E. T., WHITT G. S., NANNEY D. L., 1977. *Electrophoretic analysis of evolutionary relationships in Tetrahymena*. Evolution 31, 91-102.
- BRUNS P. J., BRUSSARD T. B., MERRIAM E. V., 1982. *In vivo genetic engineering in Tetrahymena*. Acta Protozool. 22, 31-44.
- BUTZEL H. M. Jr., 1974. *Mating type determination and development in Paramecium aurelia*. [W:] VAN (WAGTENDONK W. J. red.). *Paramecium: A Current Survey*, Elsevier, Amsterdam, 91-130.
- CECH T. R., 1987. *The chemistry of self-slicing RNA and RNA enzymes*. Science 236, 1532-1539.

- COHEN J., DUPUIS P., VIGUES B., 1990. *Expression of a ciliate gene in Escherichia coli using a suppressor tRNA to read the UAA and UAG glutamine codone*. J. Mol. Biol. 216, 189–194.
- CORLISS J. O., 1979. *The Ciliated Protozoa*. Pergamon Press, Oxford.
- CORLISS J. O., DAGGETT P. -M., 1983. „*Paramecium aurelia*” and „*Tetrahymena pyriformis*”: current status of the taxonomy and nomenclature of these popularly known and widely used ciliates. Protistologica 19, 307–322.
- CRIPPA-FRANCESCHI T., 1987. *Complementary mating types and different modes of growth in Paramecium aurelia clone*. Arch. Protistenk., 134, 379–388.
- CUMMINGS D. J., MAKI R. A., PARODA C. M., 1979. *Restriction mapping and interspecies homology of mitochondrial DNA from Paramecium*. [W:] *Specific Eukariotic Genes*, Alfred Benzon Symposium 13, Munksgaard, Copenhagen, 259–267.
- CURTENAZ S., NAHON P., IFTODE F., FLEURY A., 1994. *Interspecific immunological cross-reactions among cortical proteins of four ciliates*. Europ. J. Protistol. 30, 440–450.
- DE TERRAN., 1974. *Cortical control of cell division*. Science 184, 530–537.
- DILLER W. F., 1936. *Nuclear reorganization process in Paramecium aurelia, with description of autogamy and „hemixis”*. J. Morph. 59, 11–76.
- DIPPELL R. V., 1954. *A preliminary report on the chromosomal constitution of certain variety 4 races of Paramecium aurelia*. Caryologia 260 (suppl.), 1109–1111.
- DOERDER F. P., DITIRANTO J., DE BAULT L. E., 1981. *Evolutionary constraints on quantitative variation and regulation of macronuclear DNA content in the genus Tetrahymena*. J. Cell Sci. 49, 177–193.
- FABREGAT J., SATRUSTEGUI J., MACHADO A., 1984. *Malate dehydrogenase of Tetrahymena pyriformis: evolutionary and regulatory aspects*. Comp. Biochem. Physiol. 77B, 319–323.
- GALL J. G., 1984. *Ciliates come of age*. Nature 310, 453–454.
- GILLEY D., PREER J. R., AUFDERHEIDE K. J., POLISKY B., 1988. *Autonomous replication and addition of telomeric sequences to DNA microinjected into Paramecium tetraurelia macronuclei*. Mol. Cell. Biol. 8, 4765–4772.
- GÖRTZ H. -D., 1988. *Endosymbionts*. [W:] GÖRTZ H. D. (red.) *Paramecium*, Springer-Verlag, Berlin.
- HAYASHI H., NOMOTO M., Iwai K., 1984. *Tetrahymena histone H4. Complete amino acid sequences of two variants*. J. Biochem. 96, 1449–1456.
- HENNESSEY T. M., FREGO L. E., FRANCIS J. T., 1994. *Oxidants act as chemorepellents in Paramecium by stimulating an electrogenic plasma membrane reductase activity*. J. comp. Physiol. A 175, 655–665.
- HYVER C., LE GUYADER H., 1995. *Cortical memory in Paramecium: a theoretical approach to the structural heredity*. C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie\Life sciences 318, 375–380.
- IFTODE E., COHEN J., RUIZ F., TORRES-RUEDA A., CHEN-SHAN L., ADOUTTE A., BEISSON J., 1989. *Development of surface pattern during division in Paramecium. I. Mapping of duplication and reorganization of cortical cytoskeletal structures in the wild type*. Development 105, 191–211.
- JANKOWSKI A. V., 1962. *The conjugation process in Paramecium putrinum Clap. et Lachm. III. A multiple system of mating types in P. putrinum*. Zhurn. Obsh. Biologii 23, 267–282.
- JENNINGS H. S., 1938. *Sex reaction types and their interrelations in Paramecium bursaria. II. Clones collected from natural habitats*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 24, 117–120.
- JONES K. W., 1956. *Nuclear differentiation in Paramecium*. Ph. D. Thesis, University of Wales, Aberystwyth.
- KAPLER G. H., 1993. *Developmentally regulated processing and replication of the Tetrahymena rDNA minichromosome*. Current Opinion in Genetics and Development 3, 730–735.
- KIM C. S., PREER J. R., POLISKY B., 1992. *Bacteriophage DNA fragments replicate in the Paramecium macronucleus: absence of active copy number control*. Developmental Genetics 13, 97–102.
- KINK J. A., MALEY M. E., LING K. -Y., KANABROCKI J. A., KUNG C., 1991. *Efficient expression of the Paramecium calmodulin gene in E. coli after four TAA to CAA changes through a series of polymerase chain reactions*. J. Protozool. 38, 441–447.
- KOMALA Z., 1992. *Toxicity of Fastac 10EC, a pyrethroid insecticide, to Paramecium primaurelia and Tubifex sp.* Folia biol. (Kraków) 40, 109–112.
- KOMALA Z., 1994. *Effects of atmospheric pollution on Paramecium sp. cells*. Folia biol. (Kraków) 42, 41–44.
- KOŚCIUSZKO H., 1965. *Karyologic and genetic investigations in syngen 1 of Paramecium aurelia*. Folia biol. (Kraków) 13, 339–368.
- KOŚCIUSZKO H., PRAJER M., 1990. *Transplantation of cytoplasm from autogamonts into immature cells of Paramecium tetraurelia*. Folia biol. (Kraków) 38, 21–26.

- KOVÁCS P., CSABA G., 1994. Effect of the tyrosine kinase inhibitor tyrphostin on insulin binding and insulin imprinting of *Tetrahymena*. *Microbios* 79, 37–41.
- LANDIS W. G., 1986. The interplay among ecology, breeding systems, and genetics in the *Paramecium aurelia* and *Paramecium bursaria* complex. *Progress in Protistology* 1, 287–307.
- LIANG A., HECKMANN K., 1993. *Blepharisma* uses UAA as a termination codon. *Naturwissenschaften* 80, 225–226.
- LU M. J., DADD C. A., MIZZEN G. A., PERRY C. A., McLACHLAN D. R., ANNUNZIATO A. T., ALLIS C. D., 1994. Generation and characterization of novel antibodies highly selective for phosphorylated linker histone H1 in *Tetrahymena* and HeLa cells. *Chromosoma* 103, 111–121.
- MACHELON V., 1982. Données sur le *Euplotes vannus*: l'existence d'une cinquième espèce, analyse des mécanismes d'isolement reproductif. *Protistologica* 18, 345–354.
- MALVIN G. M., WOOD S. C., 1992. Behavioral hypothermia and survival of hypoxic protozoan *Paramecium caudatum*. *Science* 255, 1423–1425.
- MAYR E., 1963. *Animal Species and Evolution*. Belknap Press, Cambridge Mass.
- McCONNELL T. S., CECI T. R., HERSCHLAG D., 1993. Guanosine binding to the *Tetrahymena* ribozyme: thermodynamic coupling with oligonucleotide binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 8362–8366.
- MEYERS G., HELFTENBEIN E., 1988. Transfection of the hypotrichous ciliate *Stylonychia lemnae* with linear DNA vectors. *Gene* 63, 31–40.
- MIYAKE A., BEYER J., 1973. Cell interaction by means of soluble factors (gamones) in conjugation of *Blepharisma intermedium*. *Exp. Cell Res.* 76, 15–24.
- MIYAKE A., BEYER J., 1974. *Blepharmane*: a conjugation-inducing glycoprotein in the ciliate *Blepharisma*. *Science* 185, 621–623.
- NANNEY D. L., 1963. Aspects of mutual exclusion in *Tetrahymena*. [W:] Harris R. J. C. (red.). *Biological Organization of Cellular and Supercellular Levels*, New York, 91–109.
- NANNEY D. L., 1975. Patterns of basal body addition in ciliary rows in *Tetrahymena*. *J. Cell Biol.* 65, 503–512.
- NANNEY D. L., 1980. *Experimental Ciliatology*. John Wiley and Sons, Inc. New York.
- NANNEY D. L., 1982. Genes and phenes in *Tetrahymena*. *Bioscience* 32, 785–788.
- NANNEY D. L., 1984. The molecular diversity of evolutionary antiquity of the *Tetrahymena pyriformis* species complex. *Progress in Protozoology*, Warszawa, 243–266.
- NANNEY D. L., 1989. What can molecules tell us about evolution. *Boll. Zool.* 56, 205–221.
- NANNEY D. L., MCCOY J. W., 1976. Characterization of the species of the *Tetrahymena pyriformis* complex. *Trans. Amer. Micros. Soc.* 95, 664–682.
- NELSEN E. M., WILLIAMS N. E., YI H., KUSAK J., FRANKEL J., 1994. „Fenestrin” and conjugation in *Tetrahymena thermophila*. *J. Euk. Microbiol.* 41, 483–495.
- NUMATA O., SUGAI T., WATANABE Y., 1985. Control of germ cell nuclear behaviour at fertilization by *Tetrahymena* intermediate filament protein. *Nature* 314, 192–194.
- NUMATA O., TAKEMASA T., TAKAGI I., HIRONO M., HIRANO H., CHIBA J., WATANABE Y., 1991. *Tetrahymena* 14-nm filament-forming protein has citrate synthase activity. *Biochem. Biophys. res. Comm.*, 174, 1028–1034.
- NYBERG D., 1974. Breeding systems and resistance to environmental stress in ciliates. *Evolution* 28, 367–380.
- NYBERG D., 1978. Genetic analysis of trichocyst once ld stocks of *Paramecium tetraurelia*. *J. Protozool.* 25, 107–112.
- PAULI W., BERGER S., SCHMITZ S., JASKULKA L., 1994. Chemosensory responses of ciliates: a sensitive end point in xenobiotic hazard assessment. *Environm. Toxicol. and Water Quality: An Intern. J.* 9, 341–346.
- PETRIDON B., CUNY M., HAYES F., 1983. Electrophoretic mobility patterns of ribosomal proteins as an aid to phenetic classification on amiconucleate strains of *Tetrahymena*. *J. Protozool.* 30, 573–577.
- PRESCOTT D. M., 1993. Restructuring of DNA sequence in the germline genome of *Oxytricha*. *Current Opinion in Genetics and Development* 3, 725–729.
- PRESCOTT D. M., 1994. The DNA of Ciliated Protozoa. *Microbiological Reviews* 58, 233–267.
- PRZYBOS E., 1986a. Species structure in Ciliates. *Folia biol. (Kraków)* 34, 103–132.
- PRZYBOS E., 1986b. Cytological and karyological studies on Ciliates. *Folia biol. (Kraków)* 34, 241–262.
- PRZYBOS E., 1993. Species of the *Paramecium aurelia* complex in Spain. *Microbiologia SEM* 9, 113–117.
- PRZYBOS E., KOMALA Z., 1993. The *Paramecium aurelia* species complex of Poland. *Folia biol. (Kraków)* 41, 11–16.

- PRZYBOS E., KOŚCIUSZKO H., KOMALA Z., 1979. Karyological studies of strain 324 of *Paramecium triaurelia*. *Folia biol. (Kraków)* 27, 335–359.
- QUACKENBUSH R. L., 1988. *Endosymbionts of killer Paramecia*. [W:] Götz H. -D. (red.) *Paramecium*, Springer-Verlag, Berlin, 406–418.
- RAIKOV I. B., 1978. *Nucleus of Protozoa. Morphology and Evolution*. Nauka, Leningrad.
- RAY C. Jr., 1956. Meiosis and nuclear behavior in *Tetrahymena pyriformis*. *J. Protozool.* 3, 88–96., 1956.
- ROSATI G., VERNI F., 1991. Sexual recognition in Protozoa: chemical signals and transduction mechanisms. *Zool. Science* 8, 415–429.
- SMITH-SONNEBORN J., 1979. DNA repair and longevity assurance in *Paramecium tetraurelia*. *Science* 203, 1115–1117.
- SOMMERVILLE J., 1983. Isolation and translation of mRNA coding for the variant surface antigens of *Paramecium*. *Nucleic Acids res.*, 11, 7375–7385.
- SONNEBORN T. M., 1937. Sex, sex inheritance, and sex determination in *Paramecium aurelia*. *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.* 23, 378–395.
- SONNEBORN T. M., 1950. Methods in the general biology and genetics of *Paramecium aurelia*. *J. exp. Zool.*, 113, 87–148.
- SONNEBORN T. M., 1954. The relation of autogamy to senescence and rejuvenescence in *Paramecium aurelia*. *J. Protozool.*, 1, 38–53.
- SONNEBORN T. M., 1957. Breeding systems, reproductive methods, and species problems in Protozoa. [W:] MAYR E. (red.) *The Species Problem*, AAAS. Washington, 155–324.
- SONNEBORN T. M., 1966. A non-conformist genetic system in *Paramecium aurelia*. *Amer. Zool.* 6, 589.
- SONNEBORN T. M., 1975. The *Paramecium aurelia* complex of fourteen sibling species. *Trans. Amer. Micros. Soc.* 94, 155–178.
- SONNEBORN T. M., DIPPELL R. V., 1960. The genetic basis of the difference between single and double *Paramecium aurelia*. *J. Protozool.* 7(suppl.), 26.
- SOOSE M., ZULAUF J., BAUER M., STOLTE M., 1994. A comparative study on the response of two established cell lines to adriamycin. Growth and biomass production in human mesangial cell cultures and in *Tetrahymena thermophila*. *Europ. J. Protistol.* 30, 75–84.
- TAIT A., 1970. Enzyme variation between syngens in *Paramecium aurelia*. *Biochem. Genet.* 4, 461–470.
- TAKAGI I., NUMATA O., WATANABE Y., 1991. Involvement of 14-nm filament-forming protein and tubulin in gametic pronuclear behavior during conjugation in *Tetrahymena*. *J. Protozool.* 38, 345–351.
- TARR G. E., FITCH W. M., 1976. Amino acid sequence of cytochrome c from *Tetrahymena pyriformis* phenoset A. *Biochem. J.*, 159, 193–199.
- TAYLOR W. D., GATES M. A., BERGER J., 1976. Morphological changes during the growth cycle of axenic and monoxenic *Tetrahymena pyriformis*. *Can. J. Zool.* 54, 2011–2018.
- TIEDTKE A., 1982. Meiosis in *Tetrahymena thermophila*. Visualisation of chromosomes, nucleoli, spindle microtubules using silver stain. *Protistologica* 18, 33–42.
- USUKI J., IRIE T., 1983. Inter- and intrasyngenic variation of *Paramecium hemoglobin*. I. *Paramecium aurelia* complex. *Comp. Biochem. Physiol.* 75b, 415–420.
- WHEATLEY D. N., RASMUSSEN L., TIEDTKE A., 1994. *Tetrahymena*: a model for growth, cell cycle and nutritional studies, with biotechnological potential. *BioEssays* 16, 367–372.
- WILLIAMS N. E., BUHSE H. E. Jr., SMITH M. G., 1984. Protein similarities in the genus *Tetrahymena* and a description of *Tetrahymena leucophrys* n. sp. *J. Protozool.* 31, 313–321.
- WOLFE J., 1993. The ciliary membrane and its engagement in conjugation. *Advances in Cell and Molecular Biology of Membranes*, vol. 2A, Membrane Traffic in Protozoa, 149–179.
- YAO M. -C., BLACKBURN E., GALL J. G., 1978. Amplification of the rRNA genes in *Tetrahymena*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43, 1293–1296.
- YAO M. -C., YAO C. -H., 1991. Transformation of *Tetrahymena* to cycloheximide resistance with a ribosomal protein gene through sequence replacement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9493–9497.